

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARIA ARGUEDAS

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA

AGROINDUSTRIAL



Presentado por:

Br. Jhon Eder Cespedes Cáceres

**EFECTO DE LA APLICACIÓN DE FRECUENCIA
ULTRASÓNICO Y TIEMPO EN LA
ESTABILIZACION MICROBIOLÓGICA DE**

Asesor:

MSc. David Juan Ramos Huallpartupa,

Co – Asesor:

MSc. Thomas Ancco Vizcarra

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

ANDAHUAYLAS – APURIMAC – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARIA ARGUEDAS

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA

AGROINDUSTRIAL



Presentado por:

Br. Jhon Eder Cespedes Cáceres

**EFEECTO DE LA APLICACIÓN DE FRECUENCIA
ULTRASÓNICO Y TIEMPO EN LA ESTABILIZACION
MICROBIOLOGICA DE CHICHA DE JORA**

Asesor:

MSc. David Juan Ramos Huallpartupa,

Co – Asesor:

MSc. Thomas Ancco Vizcarra

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

ANDAHUAYLAS – APURIMAC – PERÚ

2019



APROBACION DEL ASESOR

Quién suscribe:

MSc., DAVID JUAN RAMOS HUALLPARTUPA por la presente:

CERTIFICA,

Que, el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial, JHON EDER CESPEDES CACERES ha culminado satisfactoriamente el informe final de tesis intitulado: "Efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónico y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora" para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

Andahuaylas, 13 de mayo de 2019

MSc. David Juan Ramos Huallpartupa

Asesor

Jhon Eder Cespedes Caceres

Tesista



APROBACION DEL CO-ASESOR

Quién suscribe:

MSc., THOMAS ANCCO VIZCARRA por la presente:

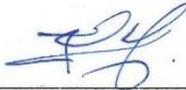
CERTIFICA,

Que, el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial, JHON EDER CESPEDES CACERES ha culminado satisfactoriamente el informe final de tesis intitulado: "Efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora" para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

Andahuaylas, 17 de mayo de 2019



MSc. Thomas Ancco Vizcarra
Co - Asesor



Jhon Eder Cespedes Caceres
Tesista



FACULTAD DE INGENIERIA

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En la Av. 28 de julio N° 1103 del Local Académico SL02 (Santa Rosa) en el Salón de Grados de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional José María Arguedas ubicado en el distrito de Talavera de la Reyna de la Provincia de Andahuaylas, siendo las 15:00 horas del día 22 de mayo del año 2019, se reunieron los docentes: Dr. Florentino Lázaro Mendoza Marín, MSc. David Choque Quispe, Ing. Juvenal Rivas Leguía, en condición de integrantes del Jurado Evaluador del Informe Final de Tesis intitulado: "EFECTO DE LA APLICACIÓN DE FRECUENCIA ULTRASÓNICO Y TIEMPO EN LA ESTABILIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CHICHA DE JORA", cuyo autor es el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial JHON EDER CÉSPEDES CÁCERES, el asesor MSc. David Juan Ramos Huallpartupa y co-asesor MSc. Thomas Ancco Vizcarra con el propósito de proceder a la sustentación y defensa de dicha tesis.

Luego de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Evaluador ACORDÓ: APROBAR por UNANIMIDAD al Bachiller en Ingeniería Agroindustrial JHON EDER CÉSPEDES CÁCERES, obteniendo la siguiente calificación y mención:

Table with 3 columns: Nota escala vigesimal (Numeros, Letras), and Mención. Handwritten values: 17, Diecisiete, Muy BUENO.

En señal de conformidad, se procedió a la firma de la presente acta en 03 ejemplares.

Dr. Florentino Lázaro Mendoza Marín
Presidente del Jurado Evaluador

MSc. David Choque Quispe
Primer Miembro del Jurado Evaluador

Ing. Juvenal Rivas Leguía
Segundo Miembro del Jurado Evaluador



APROBACIÓN DEL JURADO DICTAMINADOR

LA TESIS: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE FRECUENCIA ULTRASÓNICO Y TIEMPO EN LA ESTABILIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CHICHA DE JORA; para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, ha sido evaluada por el Jurado Dictaminador conformado por:

PRESIDENTE: PhD. Florentino Lázaro Mendoza Marín

PRIMER MIEMBRO: Ing. MSc. David Choque Quispe

SEGUNDO MIEMBRO: Ing. Juvenal Rivas Leguía

Habiendo sido aprobado por UNANIMIDAD, en la ciudad de Andahuaylas el día 22 del mes de mayo de 2019.

Andahuaylas, 11 de junio de 2019.

PhD. Florentino Lázaro Mendoza Marín
PRESIDENTE DEL JURADO DICTAMINADOR

Ing. MSc. David Choque Quispe
PRIMER MIEMBRO DEL JURADO DICTAMINADOR

Ing. Juvenal Rivas Leguía
SEGUNDO MIEMBRO DEL JURADO DICTAMINADOR

DEDICATORIA

Se le dedico al forjador de mi camino a Dios, por concederme la vida y por ser fuente de perseverancia para concluir este proyecto.

A mis padres Crispín Céspedes Llacchua y Nancy Cáceres Gutiérrez por brindarme amor, instruirme para la vida y por todo el apoyo en este proceso de formación profesional, a mis hermanas Hermenegilda, Gladys y Lucy Céspedes Cáceres, compañeros y amigos por ser protagonistas de mi vida.

Jhon Céspedes

EPÍGRAFE

***“Mientras la imaginación no tenga límites,
siempre habrá una solución al problema”***

Jhon Céspedes

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional José María Arguedas y la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial por darme la oportunidad de estudiar, a cada maestro que hizo parte del proceso de formación profesional.

En especial mi agradecimiento a mis asesores MSc. David Ramos Huallpartupa y MSc. Thomas Ancco Vizcarra, por ser una guía imprescindible y aporte en el presente trabajo de investigación, a cada uno de mis jurados de tesis Dr. Florentino Lázaro Mendoza Marín (Presidente del jurado evaluador), MSc. David Choque Quispe (Primer miembro del jurado evaluador) y Ing. Juvenal Rivas Leguía (Segundo miembro del jurado evaluador) por sus valiosos conocimientos aportados en este trabajo de investigación.

Jhon Céspedes

ÍNDICE

	Pág.
Dedicatoria	vi
Agradecimiento.....	viii
Índice general	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tablas.....	xii
Índice de anexos.....	xiii
Abreviaturas	xiv
Símbolos.....	xv
Resumen	xvi
Abstrac	xvii
Chumasqa	xviii
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Chicha de jora.....	4
2.2.1. Generalidades.....	4
2.2.2. Proceso de obtención de jora.....	5
2.2.3. Consideraciones bioquímicas del proceso de malteado	7
2.3. Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	8
2.4. Ultrasonido	11
2.4.1. Parámetros del ultrasonido de potencia	13
2.4.2. Efecto del ultrasonido.....	14
2.4.3. Estabilización de levaduras con ultrasonido de potencia.....	16
2.4.4. Aplicación de ultrasonido en la industria	16
2.5. Propiedades turbidimetría.....	18
2.6. Modelos matemáticos predictivos	19
2.6.1. Clasificación.....	20
2.6.2. Importancia de la microbiología predictiva.....	24
2.6.3. Evaluación y validación de modelos.....	24
2.7. Marco conceptual	25
2.7.1. Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	25

2.7.2.	Chicha de jora.....	25
2.7.3.	Ultrasonido de potencia.....	25
2.7.4.	Estabilización microbiológica.....	25
2.7.5.	Modelos cinéticos.....	26
CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS		27
3.1.	Lugar de ejecución.....	27
3.2.	Material de estudio.....	27
3.3.	Universo y/o población.....	27
3.4.	Muestra.....	27
3.5.	Equipos, materiales, instrumentos, reactivos e insumos	28
3.5.1.	Materiales	28
3.5.2.	Equipos e Instrumentos	29
3.5.3.	Insumos y reactivos	29
3.6.	Metodología Experimental	30
3.6.1.	Descripción de proceso de elaboración de chicha de jora.....	31
3.6.2.	Análisis del efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónico.....	33
3.6.3.	Determinación de parámetros cinéticos de inactivación de levadura.....	35
3.6.4.	Evaluación de los modelos	36
3.6.5.	Análisis estadístico	37
3.6.6.	Análisis del diseño factorial mixto.....	39
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		41
4.1.	Efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica en la inactivación microbiológica.....	41
4.1.1.	Análisis de supervivencia de unidades formadoras de colonia (UFC)	41
4.1.2.	Análisis de turbidimetría.....	45
4.2.	Determinación de parámetros cinéticos de inactivación de levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	49
4.3.	Evaluación de los modelos	53
CONCLUSIONES.....		55
RECOMENDACIONES.....		56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		57
ANEXO.....		65

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Elaboración de malta de maíz o jora.	6
Figura 2. Micrografía de células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a mil aumentos, la barra representa 5 mm.	9
Figura 3. Célula de Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	11
Figura 4. Polarización de dipolos en cerámica piezoeléctrica: (a) antes de la polarización y (b) después de la polarización.....	12
Figura 5. Generación acústica de la cavitación de burbujas.....	15
Figura 6. Diagrama de bloques de la elaboración de chicha de jora.	31
Figura 7. Regiones de conteo de microorganismos en la cámara de Neubauer improved.....	34
Figura 8. Diagrama de contrastación de variables.	37
Figura 9. Curva de inactivación microbiológica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 40 y 42 kHz de tratamiento.	42
Figura 10. Micrografía de células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a mil aumentos, tras el tratamiento ultrasónico.	43
Figura 11. Diagrama de Pareto para inactivación microbiana.	45
Figura 12. Estimación de la concentración de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> basado la escala de McFarland.....	46
Figura 13. Curva de inactivación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 40 y 42 kHz de tratamiento ultrasónico.....	47
Figura 14. Diagrama de Pareto para turbidez de chicha de jora.....	49
Figura 15. Curvas de inactivación descritos por la distribución de Weibull, ecuación modificada de Gompertz y Geerard a una exposición de 40 kHz.	50
Figura 16. Curvas de inactivación descritos por la distribución de Weibull, ecuación modificada de Gompertz y Geerard a una exposición de 42 kHz.	51

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de chicha de jora.....	5
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Tabla 3. Parámetros del ultrasonido en leche y agua	17
Tabla 4. Efecto del ultrasonido en las reducciones microbianas obtenidas en alimentos.	17
Tabla 5. Técnicas de medición de ultrasonido en alimentos.	18
Tabla 6. Análisis de inactivación de unidades formadoras de colonia.....	41
Tabla 7. Análisis de Varianza para UFC en chicha de jora.	44
Tabla 8. Ecuación de linealidad obtenida del ensayo espectrofotométrico	46
Tabla 9. Análisis de Varianza para turbiedad.	48
Tabla 10. Recuento microbiano de unidades formadoras de colonia a diferentes tiempos de tratamiento.	50
Tabla 11. Parámetros cinéticos de los modelos predictivos de inactivación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
Tabla 12. Coeficiente de determinación (R^2), desviación estándar de los residuos (RMSE) para los tres modelos propuestos.	54
Tabla 13. Factor de Ajuste (Af) y factor de exactitud (Bf) para cada modelo matemático.....	54

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Matriz de consistencia.....	66
Anexo 2. Análisis espectrofotométrico	67
Anexo 3. Análisis colorimétrico de la chicha de jora	67
Anexo 4. Gráfico de interacción: Inactivación UFC (a) y turbiedad (b).	67
Anexo 5. Gráfico de efectos principales: Inactivación UFC (a) y turbiedad (b). .	68
Anexo 6. Prueba de normalidad basado en Shafiro – Wilk.....	69
Anexo 7. Test LSD Fisher (UFC).....	69
Anexo 8. Test LSD Fisher (DO)	70
Anexo 9. Simulación de curvas de inactivación ajustados en CurveExpert	70
Anexo 10. Norma sanitaria de criterios biológicos de bebidas no carbonatadas.	72
Anexo 11. Panel fotográfico de germinación del maíz, para la producción de jora.	73
Anexo 12. Ensamblaje y acondicionamiento de un fermentador de chicha de jora.	73
Anexo 13. Panel fotográfico de chicha de jora tratado con ultrasonido.	74
Anexo 14. Imagen de Tratamiento ultrasónico a 40 kHz.	74
Anexo 15. Panel fotográfico de los análisis con microscopio trinocular adaptado a un ordenador.	75
Anexo 16. Panel fotográfico del análisis de colorimetría.	75

ABREVIATURAS

Abs	: ABstrom (Absorbancia de la muestra)
CIE	: International Commission on Illumination
DO	: Densidad óptica
HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Points (Análisis de Riesgos y de Puntos Críticos de Control)
USDA	: United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)
R²	: Coeficiente de determinación
A_f	: Factor de ajuste
B_f	: Factor de exactitud
LSD	: Least significant difference (Diferencia mínima significativa)
GL	: Grado de libertad
HPU	: High Power Ultrasound (Ultrasonido de potencia)
m.s.n.m.	: Metros sobre el nivel del mar
M	: Molaridad
N	: Normalidad
RMSE	: Desviación estándar de los residuos
SEM	: Scanning Electron Microscope (Microscopio Electrónico Barrido)

SÍMBOLOS

°C	: Grados Celsius
μm	: Micro mol
min	: Minuto
Hz	: Hertz
kcal	: Kilocalorías
mg	: Miligramo
g	: Gramos
W	: Watt
H₂SO₄	: Ácido Sulfúrico
BaCl₂	: Cloruro de Bario
dB	:Decibeles
NaOH	:Hidróxido de sodio
kHz	: Kiloherzt
MHz	: Megahertz
MPa	: Megapascal
UFC	: Unidades Formadoras de Colonia
nm	: Nanómetro
mL	: Mililitro
μL	: Microlitros

RESUMEN

La industria de los licores emplea diversos procesos de estabilización microbiológica con el propósito de interrumpir el proceso de fermentación e incidir en el desarrollo de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*); por lo que esta investigación emplea la tecnología del ultrasonido con el objetivo de evaluar su efecto en la estabilización microbiológica de chicha de jora. Para el presente estudio se elaboró chicha de jora fermentado con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) tipo alé, los cuales fueron tratados con el ultrasonido de alta intensidad a frecuencias de 40 y 42 kHz y tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos; se resultaron de obtuvieron a partir de análisis microbiológicos por el método de recuento directo en cámara de Neubauer y análisis de turbidimetría realizado bajo un análisis espectrofotométrico. A partir de dichos resultados se construyeron curvas de inactivación, los cuales fueron ajustados a tres modelos matemáticos: Weibull, Geerard y Gompertz y validados a través del cálculo de factor de ajuste y exactitud (A_f y B_f) respectivamente. Del mismo modo, dichos resultados fueron evaluados a través del análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95 %. Se observó que la frecuencia ultrasónica y el tiempo de tratamiento afectan en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual se manifiesta en la inactivación de una fracción logarítmica de 0.70 y 0.64 UFC/mL a una frecuencia ultrasónica de 40 y 42 kHz respectivamente. Del mismo modo, el modelo Weibull posee mejores relaciones estadísticas R^2 : 0.974 y 0.985; RMSE: 0.041 y 0.034; A_f : 1.004 y B_f : 1,001. Llegándose a la conclusión que la estabilización microbiológica de la chicha de jora es influenciada por la frecuencia ultrasónica.

Palabra clave: Ultrasonido, chicha de jora, estabilización microbiológica, modelos matemáticos.

ABSTRAC

Liquor industry uses diverse processes of microbiological stabilization with the purpose of interrupting the fermentation process and influence in the leaven development (*Saccharomyces cerevisiae*); therefore, this investigation employs ultrasound technology with aiming to evaluate its effect in microbiological stabilization of "Chicha de Jora". For this research "Chicha de Jora" was elaborated and fermented with leaven (*Saccharomyces cerevisiae*) type "alé", which were treated with high intensity ultrasound in frequency of 40 and 42 kHz in exposition times of 5, 10, 15, and 20 minutes. The results were obtained from the microbiological analysis with direct recount method in Neubauer chamber and turbidimetry analysis done under a spectrophotometric analysis. Based on these results, we built inactivation kinetic curves, which were adjusted to three mathematical models: Weibull, Geerard and Gompertz. They were validated through calculus of adjust and exactitude factor (A_F and B_F) respectively. In the same way, those results were evaluated through analysis of variance with a trust level of 95%. It was observed that the ultrasonic frequency and treatment time affect the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, which shows itself in the reduction of a logarithmic fraction of 0.71 UFC/mL in an ultrasonic frequency of 42 kHz. Likewise, the inactivation kinetic model with a better adjustment is the Weibull model, under its parameters b: Scale factor and n: form factor, that model present the best statistic relations R^2 : 0.974 and 0.985; RMSE: 0.041 and 0.034; A_F : 1.004 and B_F : 1,001. Getting to the conclusion that the microbiological stabilization of "Chicha de Jora" is influenced by the ultrasonic frequency.

Key words: Ultrasound, Chicha of Jora, microbiological stabilization, mathematical models.

CHUMASQA

Kay qillqam qatipaynimpi taripan, upyanapaq tikrasqa upyanakunata chaynataq tukuyniraq puriyninkunata, tanichiyninkunata ima maskaspa, mana ñawipa rikusqankunata, chaymi qawarichiyta munan imaynatas sayachinman, utaq allqachinman manaña qunchu aswan puquchinanpaq (*Saccharomyces cerevisiae*); chayraykum, kay taqwiriypi churasqa kanqa (tecnología del ultrasonido) chaynapi aypakunqa huk taripayman hinaspa chuymaynin imaynas kanqa tanichisqa mana ñawipa rikusqan saramanta aqapi. Kay qawasqanchik yachay llamkaypim hapikurqa ruranapaq mana sayachiy upallachiy atina qapariyninta (ondas ultrasónicas) hatun kallpasapa rurayninta 40 hinataq 42 kHz, chaynataq qawachikuynin utaq huñupayninkuna kanman 5, 10, 15 hinataq 20 uchuy pacha, ruruyninman chayaspa qawachinqa, ichapas imaynata qatiparqa mana ñawipa rikusqan huk niraq llamkaypi (cámara Neubauer); chaymantapas, taqwirispa maskakurqa qunchuyayninpi qawasqamanhina, chaytam huk qawachikurqa (turbimetría) nisqawan. Chay ruruyninmi rurasqa karqa qinqusqa wachikunawan, chaykunam matipasqa karqa kimsa yachapayaykunaman (modelos matemáticos) kay taqwikkunapa (Weibull, Geerard y Gompertz). Kay qawasqanchik yachay factor de ajuste hinataq exactitud (Af y Bf) hukpaqkama. Chaynallataq, Chay maskaypa ruruyninmi qawachin 95 %. Kay qunchupa pisiyaynin yanapakunqa imayna qunchuchakunin qawasqa kanqa, chaymi rikukurqa. Chaynataq, llusqsimurqa willakuy chullanchakun aswanqa imaynan qunchu qipasqanman hinallaña, ichaqa qawachikunraqmi imaynan yapakun 0.70 UFC/mL kay qinquyninmanhina 40 kHz hinataq 0.64 UFC/mL qinquyninkunapi ima 42 kHz. Allinta aswan qawachin Weibull chaymanhina, aswan churamun allin matisqata mana timpurichiqhinalla R^2 : 0.974 hinataq 0.985; RMSE: 0.041 hinataq 0.034; Af: 1.004 hinataq Bf: 1.001. Chaynapi aswan allin allin yachapakuy kay weibull nisqapa.

Pisi rimayllapi: Nisyu qapariy,sara aqamanta, mana ñawipa rikusqan tanichiy,qatipakuy yupaykuna yuyayllapi.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

La chicha de jora es una bebida fermentada oriunda del Perú, obtenida mediante una fermentación alcohólica de la materia azucarada contenida en la malta de maíz, posee un contenido alcohólico de 9 % en volumen (León, 2010). Es consumida en el Perú y en otros países latinoamericanos como Ecuador, Colombia, Bolivia, Chile, Nicaragua, Panamá y Venezuela (Aguirre, 2009). En el Perú gracias al crecimiento del sector turístico y el interés gastronómico, ha dado lugar a la puesta en valor de la chicha de jora, licor tradicional dentro de la gastronomía y cultura de los peruanos. Esta bebida es producida en muchas regiones del Perú, entre ellas la región de Apurímac y en la provincia de Andahuaylas su producción es a nivel artesanal, el cual arraiga problemas de proceso.

En la fermentación de chicha de jora, participan activamente levaduras nativas presentes en la jora, algunas son perjudiciales ya que afectan en el tiempo de conservación y en las características sensoriales; principalmente en el color, ya que una biomasa de microorganismos afecta en la turbidez. La inactivación de microorganismos resulta fundamental para los procesos de conservación de licores, en tanto los mecanismos de inactivación asociados al ultrasonido representan una opción de uso, dicha tecnología produce una alteración del equilibrio celular como consecuencia de procesos de transferencia de materia, desde el exterior al interior celular, y viceversa (Ortuño, 2014). El uso del ultrasonido para procesos de conservación, ha generado un gran interés en la industria de alimentos y bebidas, ofreciendo ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, reduciendo el tiempo de procesamiento y mejorando la calidad del producto final, lo que es un factor determinante para su comercialización (Povey, 1998), al mismo tiempo dicha tecnología es respetuosa con el medio ambiente, fácil de aplicar y versátil. Por tal razón se evaluaron los efectos de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica en chicha de jora (Anexo 1), del mismo modo se efectuaron modelización matemática de la inactivación microbiológica.

1.1. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Modelizar y evaluar la cinética de inactivación microbiológica de *Saccharomyces cerevisiae* a 40 y 42 kHz de frecuencia ultrasónica.
- Determinar los parámetros cinéticos de inactivación bajo los modelos Weibull, Gompertz y Geerard en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Ortuño (2014), aplicó ultrasonido de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos, logró la inactivación bajo las pruebas acondicionadas a 31 °C, 36 °C y 41 °C en una constante presión de 225 bar. La viabilidad de las levaduras comenzó a decaer rápidamente después de 1 min. Después de 0.5 min de tratamiento, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la cinética de inactivación a las 100 y 350 bar, y después de 1 y 1.5 min entre 100 bar y las otras tres presiones. Después de 2 min de tratamiento, la inactivación total (7 ciclos logarítmicos). Así mismo, la cinética de inactivación de *E. coli* y *S. cerevisiae* estuvieron satisfactoriamente adaptada para el modelo Weibull y para la función Gompertz, lo cual fue adaptado para incluir la etapa de crecimiento a uno de los parámetros modelo. La distribución Weibull fue útil para describir la cinética de inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ávila (2013), estudió la supervivencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en una sopa instantánea, utilizó modelos basados en distribución de Weibull. Los diferentes tiempos de incubación fueron representadas en curvas de crecimiento y muerte, los cuales se ajustaron a la distribución de Weibull. Las principales ventajas del modelo basado en la distribución de Weibull es la sencillez y su capacidad de modelar curvas de supervivencia; por lo que su aplicación puede ser de gran utilidad para el manejo y la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos ya que permite determinar la velocidad de muerte de los microorganismos patógenos.

Mejía (2012), determinó la cinética de inactivación en tratamientos ultrasónicos de alta intensidad de tres microorganismos diferentes (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*). Los resultados obtenidos sugieren que la efectividad de los tratamientos se encuentra relacionados con el tipo de pared celular de los microorganismos tratados, ya que cada uno de los microorganismos evaluados presentaron respuestas diferentes al tratamiento ultrasónico. Del mismo modo, se evidenció que a alta frecuencia de 24 kHz y amplitud de 120 μm , fueron efectivos para reducir la concentración celular, siendo la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) la más sensible. Adicionalmente se

evidenció que después de 8,0 minutos de tratamiento la efectividad del ultrasonido fue significativamente mayor.

Valbuena (2005), aplicó un modelo cinético al crecimiento de *Lactococcus lactis subsp. lactis* en leche; del mismo se calcularon los principales parámetros que describen el crecimiento microbiano (tiempo de adaptación, tasa máxima de crecimiento exponencial y tiempo de generación) a nivel del modelo primario. Los modelos aplicados para describir las curvas de crecimiento del *Lactococcus lactis* fueron muy precisos para describir las etapas del crecimiento bacteriano estudiadas, es decir, el modelo primario utilizando la ecuación de Gompertz permite la predicción del crecimiento en cada una de las temperaturas ensayadas.

2.2. Chicha de jora

2.2.1. Generalidades

La jora o malta de maíz es el resultado de la germinación de maíz; es rica en proteínas, minerales y azúcares complejos. El contenido de proteínas puede oscilar entre 8 y 11% del peso del grano, constituida principalmente por albúminas y globulina la mayor parte, y prolamina o zeínas (esta fracción representa entre 50 y 60% del total de proteínas del endospermo, por lo que se considera las proteínas de reservas más importantes se encuentran en el endospermo). En las regiones andinas se suele utilizar en chicha de jora es una bebida con una baja graduación alcohólica obtenida por medio de una fermentación alcohólica de la materia azucarada contenida en el mosto del maíz germinado (Manrique, 1987).

Según las normas ecuatorianas la chicha de jora se entiende a los productos de fermentación alcohólica de mosto de jora (malta de maíz), frutas y otros vegetales que tienen las características propias según su origen (NTE INEN 338, 1992). Del mismo modo esta bebida es rica en calcio, fósforo y otros nutrientes como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de chicha de jora.

Contenido en 100 g de chicha de jora	
Energía (kcal)	28.0
Agua (g)	93.2
Proteína (g)	0.40
Grasa (g)	0.30
Carbohidratos (g)	5.80
Fibra (g)	0.20
Ceniza (g)	0.30
Calcio (mg)	22.0
Fosforo (mg)	18.0
Hierro (mg)	1.80
Tiamina (mg)	0.02
Riblofamina (mg)	0.1
Niacina (mg)	0.2
Ácido ascórbico reducido	2.4

Fuente: Ministerio de salud (2002).

Las características sensoriales predominantes en color tienden a pardo oscuro y tornándose a pardo claro, lo mismo puede variar a través del tiempo de duración de la fermentación, iniciándose con un color pardo claro, aunque varía dependiendo de la materia prima utilizada, puede encontrarse chicha de jora desde el blanco amarillento hasta el blanco rosa. Este se incrementa con el tiempo de elaboración de la chicha, mientras el aroma tiende a una sensación dulce de jora (Ayma, 2012).

2.2.2. Proceso de obtención de jora

La elaboración de malta o malteado es el primer paso en la elaboración de la chicha y es el proceso por cual se obtiene la materia prima principal que es malta. Básicamente es la germinación controlada de un cereal, seguida por la interrupción de este proceso natural, y finalmente el secado del grano por medio de calor (Gigliarelli, 2013). Como se muestra en la Figura 1 del proceso de elaboración de malta. El proceso, consta de los siguientes procesos:

a. Recepción

El maíz llega a las instalaciones de las malterías en donde es almacenada en condiciones adecuadas de acuerdo a su origen y variedad.

b. Hidratación

Para poder activar las enzimas útiles para el malteado es necesario hidratar el grano llevando su humedad a un 35 a 46 por ciento. Para el cual se remoja por inmersión en agua a temperatura de 15 °C, cuando la humedad es adecuada comienza el proceso germinativo y la demanda de oxígeno aumenta, así como la emisión de dióxido de carbono (Gigliarelli, 2013).

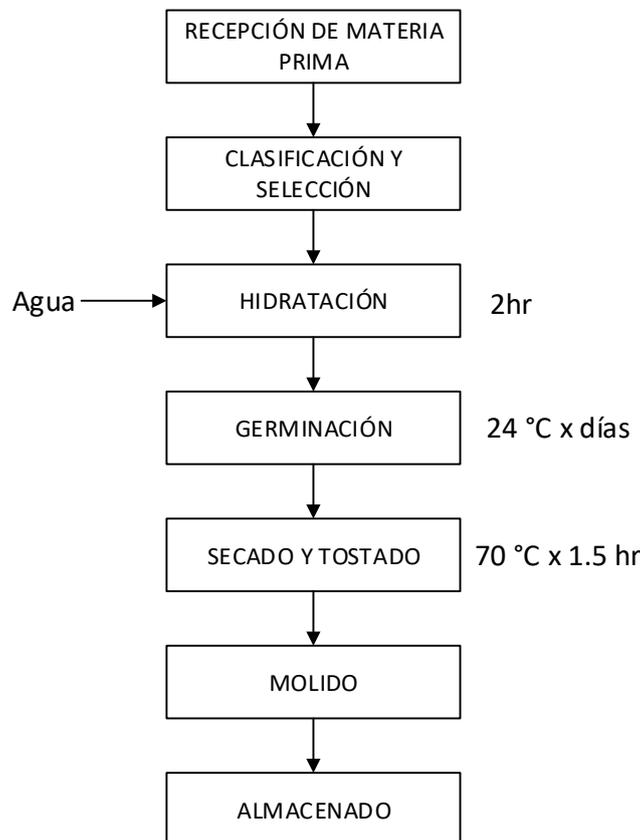


Figura 1. Elaboración de malta de maíz o jora.

Fuente: Kunze (2006).

c. Germinación

Las proteínas se descomponen en aminoácidos, las paredes de las células de almidón en beta - glucanos de bajo peso molecular y parte del almidón (sólo ocho a diez por ciento) en azúcares más simples. Del mismo modo durante la germinación o malteo el ácido giberélico da lugar a las α -amilasas (enzima dextrogénica) y por difusión se activan las β -amilasas presentes (enzima sacarogénica) produciendo amilasas (α -amilasa) para la conversión del almidón en azúcares fermentables; el grano germinado constituye el principal agente sacarificante (García, 2004).

d. Secado

Durante el secado, además de disminuir el contenido de agua y de detener la modificación del grano se forman componentes de aroma, sabor y color. Normalmente las temperaturas de secado para maltas tipo lager son de 55 a 70 °C. Finalmente se realiza la fragmentación de los granos tostados para obtener la malta en polvo (Varnam, 1997).

2.2.3. Consideraciones bioquímicas del proceso de malteado

El proceso de malteado inicia con la hidratación del almidón, lo que permite la segregación de enzimas o fermentos solubles, cuya única función es el de transformar las sustancias de reserva del grano de insolubles en materias nutritivas solubles a efecto del aprovisionamiento de azúcares y mantener con vida el embrión. Mientras el grano germina, en su interior, se van formando diastasas específicas, las cuales actúan sobre los distintos componentes del mismo, almidones, proteínas, elementos fosfatados, etc. por otro lado, se forma nuevos compuestos enzimáticos como carbohidratasas, lipasas, fosfatasas, proteasas y desmolasas, las cuales actúan en la sacarificación del mosto. La fosfatasa produce la desfosforilación del almidón reduciendo su viscosidad y favoreciendo su licuefacción. Las amilasas actúan sobre el almidón transformándolo en dextrinas, que es un azúcar no fermentable por las levaduras, y sobre la dextrina transformándola en maltosa, que es el azúcar que contiene el mosto de malta, el cual puede ser transformado en alcohol por las levaduras. La sintasa es otra enzima que ataca las paredes de las células del almidón, y esto es muy importante ya que de eso depende la suavidad de la malta. Así las enzimas proteolíticas

actúan sobre el gluten y el gleurona de la semilla, produciendo su degradación a cuerpos aminados más simples, los cuales podrán ser utilizados como alimentos nitrogenados por las levaduras durante la fermentación del mosto (Velásquez, 1982).

Los granos secos de maíz contienen solamente beta-amilasa. El aumento de la actividad de la amilasa en el grano durante la germinación es, principalmente, por la alfa-amilasa, la cual, cuando la actividad amilolítica está en lo máximo, tiene el 90% de actividad total en el endospermo. La alfa-amilasa se origina en el escutelo y es secretada dentro del endospermo, mientras que la beta-amilasa aparece formándose solamente en el endospermo. Las moléculas de maltosa por la acción de la amilasa, son degradadas por la enzima maltasa, que existe en la malta, y convertidas en moléculas sencillas de glucosa lo que antecede demuestra la especificidad absoluta de estas enzimas (Briggs, 2004).

2.3. Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Las levaduras según su clasificación taxonómica (Tabla 2), pertenecen al reino fungí, son hongos unicelulares no filamentosos, con una morfología característica esférica u ovalada que se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza (Santamaria, 1997). Sus características fisiológicas permiten fermentar determinados carbohidratos y si puede usar o no determinadas fuentes de nitrógeno como los nitratos (Hough, 1990).

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Taxon	Nombre	Descripción
Reino	Fungí	
Filum	<i>Ascomicotina</i>	Formas Teliomorficas caracterizados por la formación de ascosporas encerrados dentro ascas
Sub-Filum	<i>Saccharomycotina</i>	
Clase	<i>Saccharomycetos</i>	Ascas no están dentro de ascosporas, se desarrollan directamente de cigotos
Orden	<i>Saccharomicetalos</i>	Levadura rara vez en hifas

Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>	
Genero	<i>Saccharomyces</i>	Forma ovoide, elíptica o cilíndrica.
Especie -	<i>S. cerevisiae</i>	

Fuente: Briggs (2004).

Una célula de levadura de cerveza completamente desarrollada tiene entre 8 y 14 μm (Figura 2). Hammond (2000), definió las características más importantes para una levadura de cervecería:

- Una fermentación rápida, pero sin exceso de crecimiento en biomasa de la levadura
- Una buena conversión de la maltosa y de la maltotriosa en etanol
- Resistencia al etanol
- Resistencia a la presión osmótica
- Perfiles aromáticos equilibrados y reproducibles
- El carácter de flocular eventualmente
- Una buena estabilidad genética a lo largo del tiempo

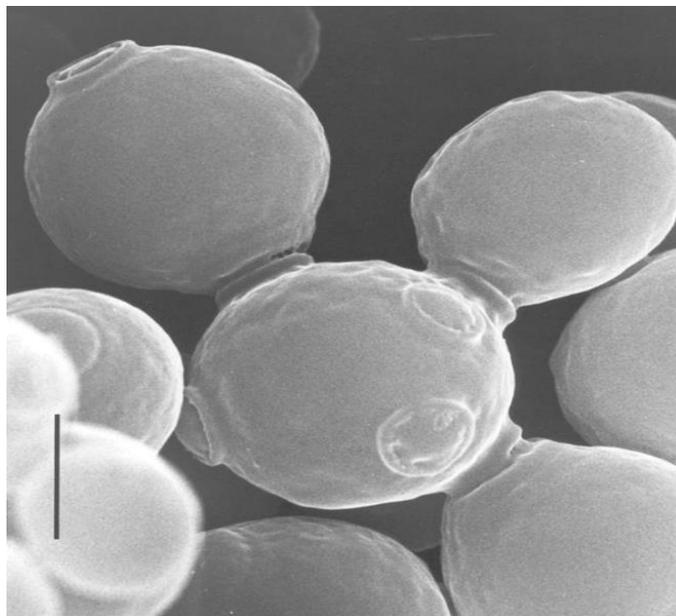


Figura 2. Micrografía de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* a mil aumentos, la barra representa 5 μm .

Fuente: Kunze (2006).

Citología de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* presenta una humedad de 70 – 80 % y pared celular similar a las células de los vegetales la cual representa el 30 % del peso seco total y tiene un grosor de 100 – 200 nm. Está constituida aproximadamente de un 40 % de β - glucano, 40 % de α - mananos, 8 % de proteínas, 7 % de lípidos, 3 % de sustancias inorgánicas, 2 % de hexosamina y quitina (Ferreira, 2010). La membrana es el lugar donde se asientan muchas proteínas y glucanos (Figura 3), muchos de los componentes son enzimas o están implicadas de una u otra manera en el transporte de sustancias hacia el interior y hacia el exterior de la célula, también la membrana celular es el sitio donde se produce energía en la célula la membrana puede estar en una forma energéticamente cargada en la que existe separación de los protones (H^+) y de los iones hidroxilo (OH^-) a través de su superficie esta separación de carga es una forma de energía potencial presente en una batería cargada, este estado energético de la membrana se conoce como Fuerza Motriz de Protones (Feuillat, 1998).

El transporte de las sustancias hacia adentro y hacia afuera de las células, así como su traslado entre el citoplasma y las diversas organelos sub celulares (mitocondria, núcleo, etc.) está determinada por la membrana y constituye una de las funciones más importantes de éstas (International Commission on Microbiological, 2005).

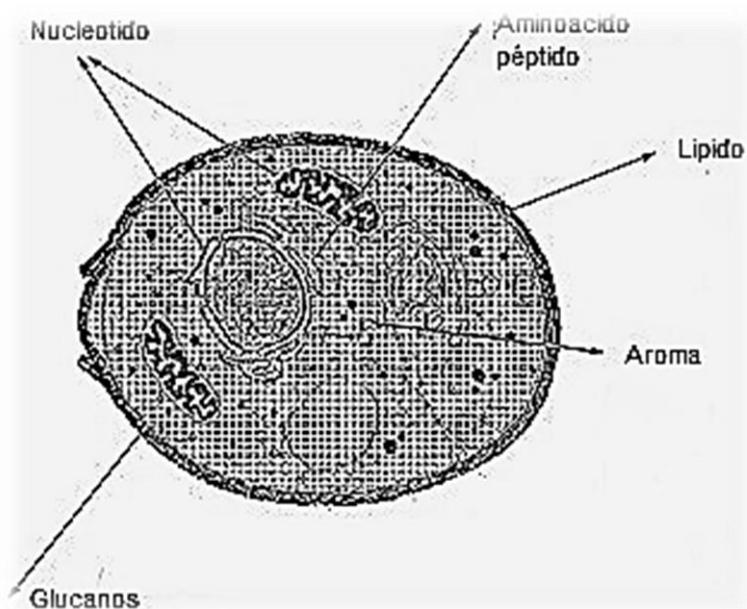


Figura 3. Célula de Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Fuente: Feuillat (1998).

Las características hidrofóbicas de la membrana le permiten funcionar como una barrera estricta. Aunque algunas pequeñas moléculas hidrofóbicas, pueden pasar la membrana por difusión, las moléculas hidrofílicas y cargadas no lo atraviesan y deben ser transportadas de modo específico. Incluso, una sustancia tan pequeña como el ion de hidrógeno (H⁺) no es capaz de pasar la membrana citoplasmática por difusión.

2.4. Ultrasonido

La generación de ultrasonido se fundamenta en la deformación elástica de los materiales ferro eléctricos dentro de un campo eléctrico de alta frecuencia y es causada por la mutua atracción de moléculas polarizadas. Para el cual se debe transmitir una frecuencia alternante mediante dos electrodos hasta el material ferro eléctrico, después se obtiene la conversión a oscilación mecánica y el sonido puede ser transmitido a un amplificador para finalmente transmitir al medio (Reich, 2000).

Hoover (2000), define ultrasonido como una forma de energía que viaja en ondas de sonido iguales o mayores a 20000 vibraciones por segundo esto a su vez produce compresión (alta presión) y rarefacción (baja presión) y cuya frecuencia supera a la del sonido audible por el oído humano: 20 kHz. Las ondas ultrasónicas de baja intensidad, son aquellas en la que la energía ultrasónica se utiliza para producir cambios permanentes en el medio, mientras los ultrasonidos de potencia se asignan a las aplicaciones de elevada intensidad. Los valores medios de intensidad entre estos dos tipos de ultrasonido varían entre 0.1 w/cm² y 1 W/cm².

Mason (1998), establece que el rango de sonido empleado es muy amplio se puede dividir en los de alta frecuencia baja energía en el rango de MHz aplicado como ultrasonido de diagnóstico y de baja frecuencia alta energía.

Ultrasonido de potencia (High Power Ultrasound – HPU)

Los sistemas de ultrasonidos constan de tres partes fundamentales: generador, transductor y emisor. El generador es el encargado de transformar la señal

eléctrica de la red a la frecuencia deseada; el transductor convierte la señal eléctrica de alta frecuencia en vibraciones mecánicas; y el emisor irradia la energía acústica generada por el transductor al medio a tratar (Cárcel, 2003).

El fundamento de los transductores piezoeléctricos se basa en el efecto piezoeléctrico; dicho efecto puede considerarse que contiene dipolos elementales, consistentes en una carga positiva y una carga negativa a una cierta distancia. Para obtener actividad piezoeléctrica los dipolos deben primero ser orientadas, los cuales en un principio no muestran preferencias por alguna dirección en particular, cuando el material cerámico es expuesto a un fuerte campo eléctrico externo a una temperatura, no más allá de la llamada temperatura de Curié (La temperatura de Curié es aquella en el que la permeabilidad relativa de los materiales ferromagnéticos es ínfima). A esta temperatura los dipolos naturales desaparecen y son creados nuevamente en forma espontánea cuando disminuye la temperatura (Figura 4). Bajo estas condiciones polares los dipolos toman una dirección correspondiente a la dirección del campo de polarización (Chuchuca, 2012).

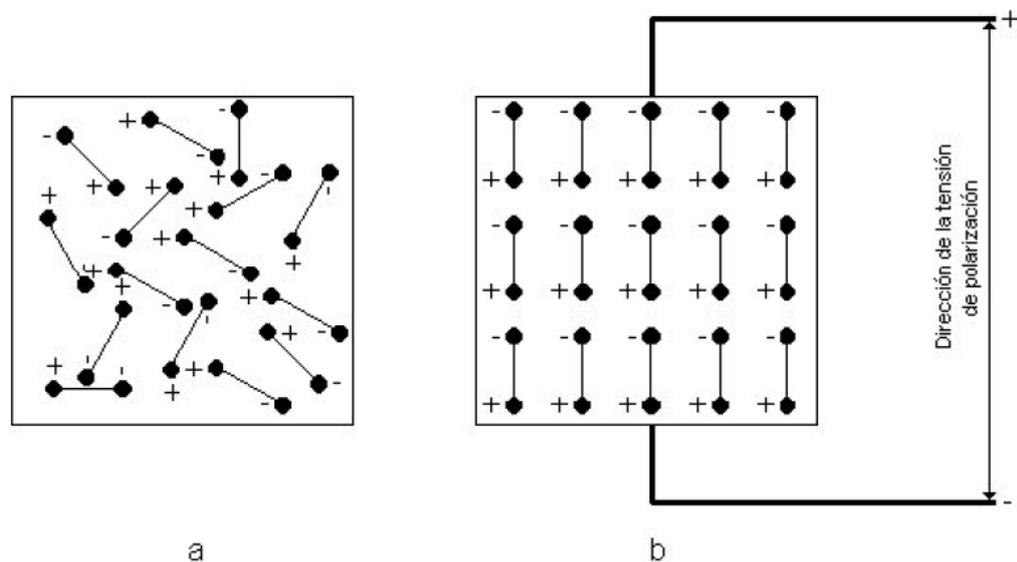


Figura 4. Polarización de dipolos en cerámica piezoeléctrica: (a) antes de la polarización y (b) después de la polarización.

Fuente: Gonzales (2009).

Tras la remoción de los campos de polarización y enfriar el material los dipolos no pueden volver fácilmente a su posición original y lo que se obtiene es llamado

polarización remanente del material cerámico, entonces el cuerpo cerámico se ha convertido en forma permanente en piezoeléctrico y puede convertir energía mecánica en eléctrica y viceversa (Gonzales, 2009).

2.4.1. Parámetros del ultrasonido de potencia

- a. **Longitud de onda:** La longitud de onda indica el tamaño de una onda, es decir, la distancia entre el principio y el final de una onda completa (ciclo). La longitud de onda está dada por la relación de velocidad del sonido y la frecuencia ultrasónica. La importancia de esta relación es que entre más alta es la frecuencia ultrasónica, más pequeña será la longitud de onda (Zagzebski, 1996).
- b. **Frecuencia:** Número de oscilaciones (ciclos) por unidad de tiempo. Es medida por hertz (Hz), kilohertz (kHz) y megahertz (MHz). Un hertz es un ciclo por segundo o una completa variación por segundo. Si la frecuencia se incrementa, el periodo decrece y viceversa (Kremkau, 2002).
- c. **Amplitud:** La amplitud es el pico máximo que alcanza la onda desde su posición inicial, es decir, la altura de la curva. La amplitud indica la cantidad de energía que contiene una onda (Lempriere, 2002).
- d. **Potencia:** La potencia acústica es la cantidad de energía producida por el transductor por unidad de tiempo. La potencia está determinada por la amplitud de la onda cuanto mayor es la amplitud de la onda mayor es la cantidad de energía que se genera (Kremkau, 2002).
- e. **La intensidad:** Es la cantidad de energía que atraviesa una superficie por una unidad de tiempo, la cual determina la dosis de tratamiento (Ecuación 1). Cuando se incrementa el área decremento la intensidad, disminuyendo el área incrementa la intensidad porque la potencia está concentrada (Lempriere, 2002).

$$Dosis\ o\ Tratamiento = \frac{Potencia\ (w/cm^2) * ERA * \% * Tiempo(s)}{Superficie\ tratada\ (cm^2)} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

ERA: superficie real de emisión del transductor.

?: Fracción de pulso

Cuando una onda atraviesa un material pierde paulatinamente intensidad como consecuencia de su interacción con el material, es decir, la onda se atenúa. La atenuación se debe a dos mecanismos distintos: absorción y dispersión. En términos prácticos, una onda de 12 MHz perderá 120, 6 y 0,0024 dB/cm de recorrido, en medio sólido, viscoso y acuoso, respectivamente. Específicamente conductores como el vidrio se atenúa a razón de 19750 dB/cm a 40 kHz de frecuencia.

En la absorción, parte de la energía de la onda se transforma en energía calorífica del medio, produciéndose una elevación de la temperatura de éste. La dispersión consiste en que parte de la onda es desviada del rayo inicial a consecuencia de las irregularidades del medio (Ortuño, 1996).

2.4.2. Efecto del ultrasonido

Los HPU alteran y modifican el medio circundante debido a efectos asociados puede explicarse mediante varios mecanismos asociados.

a. Cavitación

Los efectos de la ultrasonicación de líquidos incluso homogeneización, dispersión, desaglomeración, pulverización, emulsión, extracción, lisis, fragmentación y efectos sonoquímicos son causados por cavitación. Según la Figura 5, al introducir ultrasonidos de alta potencia en un medio líquido, las ondas sonoras se transmiten en el fluido y crean ciclos alternos de alta presión (compresión) y baja presión (rarefacción), con tasas dependiendo de la frecuencia. Durante el ciclo de baja presión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío o vacíos en el líquido (Rivas, 2007).

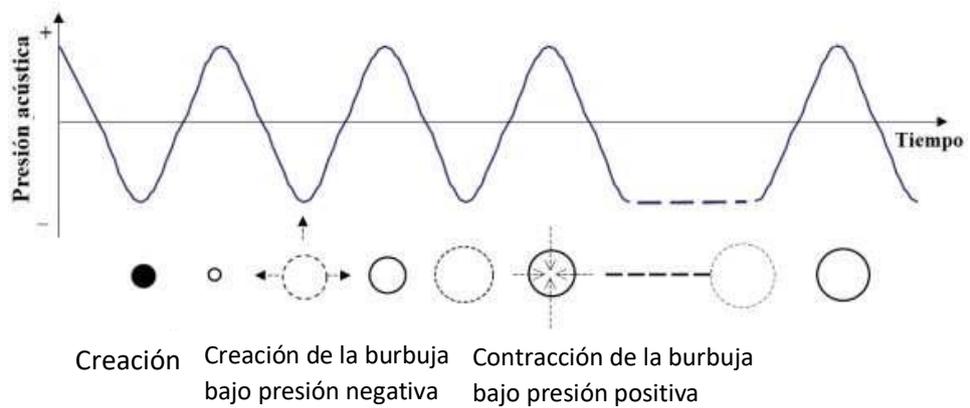


Figura 5. Generación acústica de la cavitación de burbujas.

Fuente: Rivas (2007).

El colapso de las burbujas libera una cantidad de energía que puede producir diversos efectos químicos y/o mecánicos. En el punto donde se produce la implosión de una burbuja de cavitación, se generan temperaturas de alrededor de 4000 °K y presiones que pueden alcanzar los 100 MPa. La vida media de estos “puntos calientes” es de apenas 0,1 μ s, (Cárcel, 2003). El colapso de las burbujas es muy rápido y potente y produce fuerzas cortantes capaces de romper fuertes enlaces químicos.

b. Calentamiento

Es el resultado de la propagación de las ondas ultrasónicas en un medio, todas las partículas de dicho medio se encuentran vibrando, transformando parte de la energía acústica en calor al oponer resistencia viscosa a esta vibración (Mason, 1998).

c. Micro agitación

Esta microagitación se genera por la interacción de la onda acústica, que viaja por el fluido, con el sólido. La importancia de esta agitación estriba en que se forma justo en la interfase, disminuyendo el espesor de la capa límite de difusión e incrementando la transferencia de materia y energía en forma de calor (García, 2009).

2.4.3. Estabilización de levaduras con ultrasonido de potencia

El mecanismo de la inactivación microbiana mediante ultrasonidos de alta intensidad se atribuye fundamentalmente al fenómeno de cavitación, al aumento de temperatura, a la formación de radicales libres, a la turbulencia, al esfuerzo cortante y a la compresión y rarefacción (Knorr, 2004). Todos estos fenómenos contribuyen a la destrucción de las células microbianas (Piyasena, 2003). A pesar de producir altas temperaturas, éstas tienen efecto limitado sobre la inactivación microbiológica por ser muy puntuales o focales, afectando a una región reducida y abarcando por lo tanto a un bajo número de microorganismos.

Sin embargo, durante este fenómeno de cavitación, se libera gran cantidad de energía en forma de presión favoreciendo los procesos de transferencia de materia y diferentes reacciones químicas que también contribuyen a la muerte de los microorganismos.

La extensión de los daños sonoquímicos y físicos varía dependiendo de los parámetros del tratamiento ultrasónico como son la frecuencia y la intensidad. Otros factores que influyen sobre la efectividad microbicida de los ultrasonidos se relacionan con el tipo de microorganismo y su estado fisiológico, el tipo de alimento/medio donde se encuentran y la temperatura del tratamiento (Piyasena, 2003).

2.4.4. Aplicación de ultrasonido en la industria

En la industria de los alimentos la tecnología del ultrasonido ha sido empleada en diferentes investigaciones, debido a que se puede aplicar de forma versátil y sobre todo ambientalmente sustentable; su aplicación de dicha tecnología se puede dar de tres maneras (Kremkau, 2002).

- Aplicación directa al producto
- Acoplada a un dispositivo
- Sumergido en un baño ultrasónico

Para que la tecnología de ultrasonido pueda aplicarse en procesos alimenticios, se considera que el criterio de mayor importancia es la cantidad de energía del campo generador de sonido. Está caracterizado por el poder (W) y la intensidad (W/m^2) del sonido, en la Tabla 3 se muestra los parámetros y su efectividad del

ultrasonido en reducción de microorganismos en un medio líquido como el agua y leche.

Tabla 3. Parámetros del ultrasonido en leche y agua

Fluido	Densidad (kg/m³)	Velocidad del sonido (m/s)	Impedancia (10⁶ kg/m²/s)	Atenuación (m/s²)
Agua 20 °C	998.23	1488.30	1.4	0.00013
Leche 20 °C	1030.00	2050.00	2.1	0.00019

Fuente: Rivas (2007).

Tabla 4. Efecto del ultrasonido en las reducciones microbianas obtenidas en alimentos.

Alimento	Tratamiento	Condiciones de tratamiento	Reducción microbiana Log (UFC/g)	Referencia
Fresa	Ultrasonido	40 kHz, 20 °C, 10 min	Mesofilo: 0.6 Levadura:0.5	(S. Cao, 2010)
Lechuga	Ultrasonido	20 kHz 53 min	E. coli: 4,4	(Elizaquibel P., 2012)
Zumo de mango	Ultrasonido	45 kHz, 60 min	Reducción completa de mesófilos	(Porras, 2011)

Fuente: Rivas (2007).

En los procesos de desinfección de fresa el efecto inactivador del ultrasonido sobre los microorganismos Mesófilos representa una reducción de 0.6 ciclos logarítmicos mientras que en lavaduras representa una reducción de 0.5 ciclos logarítmicos (Tabla 4).

El efecto del ultrasonido sobre los agentes alterantes de los alimentos es limitado y dependiente de múltiples factores, por ello, su aplicación se ha encaminado hacia la combinación simultánea de los diferentes factores físicos como el tratamiento térmico suave (< 100 °C, habitualmente entre 50 – 60 °C) ha dado lugar al procedimiento denominado termoultrasonificación. La combinación con incremento de presión (< 600 MPa) se denomina manosonificación, mientras que

las tres estrategias de forma conjunta se conocen como manitermosonificación (Reyns, 2000).

Investigaciones recientes hacen uso del ultrasonido de baja energía en el control de procesos mediante detección no invasiva y la caracterización de propiedades físico - químicas de materiales alimenticios, deshidratación de vegetales y salado de carne (Ozuna, 2014); estas aplicaciones mencionadas están asociadas a procesos de transferencia de materia, de acuerdo a la Tabla 5 muestra el uso de ultrasonido en la inactivación de microorganismos y enzimas, operaciones de limpieza, mejora de reacciones químicas, tenderización de carne, formación de emulsiones o procesos de corte de alimentos (Mason, 1998).

Tabla 5. Técnicas de medición de ultrasonido en alimentos.

Características	Propiedades del material a obtener	Técnica usada
Velocidad de sonido y densidad en proteínas	Compresibilidad adiabática e hidrofobicidad de las proteínas	Pocos MHz
Velocidad de sonido medido durante el enfriamiento de agua, grasas, emulsiones y dispersiones.	Fracción del volumen de cristales, temperatura de la fase de transición.	Pocos MHz
Amplitud de las ondas de compresión como una función de frecuencias en proteínas de leche y emulsiones aceite.	Distribución del tamaño de las partículas, agregación.	1-200 MHz

Fuente: Povey (1998).

La variación de esas dos propiedades (atenuación y velocidad del sonido) depende de las propiedades del sistema líquido. Si se mide la variación de esas propiedades ultrasónicas entonces será capaz de extraer información acerca de las propiedades del sistema (Dukhin 2005).

2.5. Propiedades de turbidimetría

Turbidez se refiere a la conversión de un medio líquido traslúcido a turbio por efecto de la multiplicación bacteriana debido a la capacidad de los microorganismos de dispersar la luz (Price & Frey, 2003).

La turbidimetría es un método indirecto para estudiar el crecimiento bacteriano mediante la cuantificación de la densidad óptica que genera un cultivo, ya que una

población microbiana genera turbidez en un medio líquido. Esta técnica se basa en el hecho de que las células bacterianas son capaces de absorber y dispersar un haz de luz incidente dependiendo de su concentración, tamaño y forma, esto permite determinar con bastante exactitud la cantidad de microorganismos en la suspensión mediante la determinación de la turbiedad mediante un nefelómetro o un espectrofotómetro (Bajaj et al., 1991).

La cantidad de luz transmitida se registra como porcentaje de transmitancia y también en unidades de absorbancia (Price & Frey, 2003). La absorbancia (Ecuación 2) se define como el logaritmo decimal del cociente entre la intensidad de la luz incidente sobre la suspensión (I_0) y la luz transmitida por la suspensión (I) (Stanier, 1989).

$$A = \frac{\log(I_0)}{I} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Esta técnica se basa en el hecho de que las partículas pequeñas difractan la luz, dentro de ciertos límites, de manera proporcional a su concentración. Cuando un haz de luminoso atraviesa sobre una suspensión bacteriana, la reducción en cantidad de luz transmitida a consecuencia de la difracción se traduce en la medida de masa bacteriana presente.

Entre las principales aplicaciones de los métodos turbidimétricos se pueden citar (Harrigan, 1998):

- Estandarización de suspensiones de cultivos puros de bacterias destinadas a experimentos de laboratorio.
- Ensayos de vitaminas, antibióticos, entre otros inhibidores de crecimiento microbiano.
- Determinación de la influencia de diversas condiciones ambientales sobre el crecimiento microbiano.

2.6. Modelos matemáticos predictivos

Son modelos matemáticos que expresan relaciones, proposiciones sustantivas de hechos, variables, parámetros en función al tiempo, cuyo objetivo principal es describir, explicar, predecir y controlar algún proceso. Las observaciones están ordenadas respecto al tiempo, donde las sucesivas observaciones son generalmente dependientes; característica que es de vital importancia a la hora del análisis de la serie (Correa, 2004).

El uso de esta técnica, facilita analizar cuestiones sobre el deterioro microbiano de los alimentos y sobre la seguridad alimentaria pueden responderse mediante análisis simplificado de los procesos bioquímicos de la cinética bacteriana que pueden ayudar a elaborar una predicción de las condiciones microbiológicas que presentará un alimento en un proceso determinado durante la cadena alimentaria (Farkruddin et al., 2011).

Los modelos utilizados se basan en datos que describen y caracterizan las respuestas microbiológicas frente a factores ambientales; del mismo modo, los modelos han de desarrollarse partiendo de una serie de etapas que permiten identificar los factores claves que afectan al crecimiento microbiano (Geeraerd et al., 2004).

2.6.1. Clasificación de modelos

Los modelos predictivos pueden dividirse en modelos cinéticos y modelos de probabilidad. El modelo cinético calcula la vida microbiológica de los productos alimentarios, es decir, el periodo de tiempo durante el cual el número de los microorganismos en el alimento es menor al límite máximo permisible de microorganismos presentes en dicho alimento; mientras el modelo de probabilidad determina si el microorganismo puede crecer en el medio, e identifica la condición de almacenamiento con baja o nula probabilidad de crecimiento (Tienungoon, 2000).

Los modelos predictivos pueden ser clasificados según su fundamento matemático (Roels y Kossen, 1978), según modelos primarios, secundarios y terciarios, siendo ésta última clasificación propuesta por Whiting y Buchanan (1993) la más utilizada en la comunidad científica, ya que incluye, complementa y unifica las anteriores (Geeraerd et al. 2004).

a. Modelos Primarios

Los modelos primarios se ocupan de la descripción de los cambios del número microbiano en función del tiempo (crecimiento, supervivencia, inactivación). Cuantitativamente puede incluir unidades formadoras de colonia (UFC) biomasa, medidas de absorbancia, además de los niveles de substratos o de productos metabólicos producidos (Geeraerd y col., 2004).

Su principal objetivo es averiguar la cinética de crecimiento de los distintos microorganismos con el mínimo de parámetros posibles, evitando así la pérdida de exactitud de los valores con cálculos muy elaborados. Estos modelos (Tabla 6) nos proporcionan información específica de los microorganismos a estudio, como son el tiempo de generación, la duración de la fase de latencia o fase lag, la velocidad máxima de crecimiento (Forsythe, 2002; Baranyi y Roberts, 1994).

Tabla 6. Clasificación de los modelos predictivos

Modelos primarios	Modelos secundarios	Modelos terciarios
Función de Gompertz	Modelo de (Modelos cuadrada)	Belehradek de raíz Pathogen Modeling Program: USDA.
Gompertz modificada	Modelo (modelo cuadrada)	Ratkowsky de raíz Seafood Spoilage (and Safety) Predictor of SSP o SSSP.
Modelo logístico	Modelo de Arrhenius	Salmonella enteritidis Risk Assessment: USDA
Modelo Baranyi	Modelo modificado de Arrhenius (Davey o Schoolfield)	ComBase
Modelo de primer orden de Monod	Modelos probabilísticos	MicroFit
Modelo de primer orden modificado	Valores Z	Perfringens predictor
Valores D de inactivación térmica	Polinomiales o respuesta	Food MicroModel: UK

Fuente: Whiting y Buchanan (1993).

Distribución de frecuencias de Weibull

El Análisis de supervivencia es una técnica inferencial que tiene como objetivo esencial modelizar el tiempo que se tarda en ocurrir un

determinado suceso; no obstante, no todos los datos se ajustan a tales modelos, por lo cual es necesario proponer modelos más generales, para así explicar el comportamiento de los datos aun cuando no se ajusten a cierto modelo, además factores como el tiempo de vida de un objeto depende de otras variables, las cuales son explicables y que denominaremos covariables del fenómeno (Cox, 1984).

El modelo de Weibull es utilizado en estudios que involucran tratamientos térmicos y no térmicos, principalmente se basa en la resistencia al estrés de una población y que las curvas de supervivencia microbianas y de esporas bacterianas siguen una distribución de tipo Weibull o primer orden. Este tipo de modelos pueden describir curvas lineales, cóncavas o convexas (Coroller et al., 2006).

Las curvas de inactivación representan la distribución de la resistencia del conjunto de la población al tratamiento. Por esta razón, se puede decir que no existe una relación lineal entre el tiempo de tratamiento al que se someten los microorganismos y la muerte de cada uno de ellos. Aparte, este modelo posee una gran sencillez, ya que se puede interpretar con curvas, hombros y colas, y líneas rectas (Gougouli y Koutsoumanis, 2012; Huang y col., 2012).

Ecuación modificada de Gompertz

La aplicación inicial de la ecuación modificada de Gompertz está dada para la descripción de curvas de crecimiento con forma sigmoideal (Gibson, 1987). La utilidad de la fórmula en curvas de supervivencia fue demostrada por Bhaduri (1991) en la inactivación de la bacteria *Listeria monocytogenes* tras tratamientos térmicos.

La ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 5) originalmente diseñada para interpretar curvas de crecimiento, fue demostrada por (Linton, 1997) tras estudiar curvas de supervivencia no-lineales de bacterias por tratamientos térmicos.

Modelo de Geerard

Este modelo está basado en diversos argumentos que describen el comportamiento de los microorganismos cuando describen curvas de

inactivación se hacen presentes fenómenos de hombro, fase log-lineal y cola (Casolari, 1988).

b. Modelos Secundarios

Los modelos secundarios caracterizan los parámetros que pueden aparecer en los modelos primarios en función de las condiciones de medio (temperatura, pH, actividad de agua, etc.). considerando dos o más factores que interactúan en el crecimiento microbiano. Los parámetros cinéticos de crecimiento del microorganismo proporcionados por los modelos primarios, se construyen expresiones matemáticas que describen la respuesta de éstos frente a cambios en los parámetros ambientales, que afectan tanto a factores intrínsecos del producto (pH, [sales], [NO₂], etc.), como a factores extrínsecos (temperatura de almacenamiento, humedad relativa, interacción con otros microorganismos, etc.) (Lebert et al. 2000, Zurera et al. 2006, Geeraerd et al. 1998).

c. Modelos Terciarios

Los modelos terciarios se obtienen por integración de los modelos primarios y secundarios, simplificándolos de forma específica mediante software, el cual permite determinar la extensión y tasa de crecimiento del microorganismo, así como comparar los efectos producidos en diferentes condiciones. Con este tipo de tecnología se puede estimar la vida útil del producto alimentario o minimizar el riesgo de pérdida de calidad e inocuidad del alimento.

Los modelos terciarios pueden tener varias formas, comenzando por combinar los dos primeros niveles de modelos basados en experimentos de laboratorio ("Pathogen Modeling Program", creado por la comunidad científica USDA); versiones más extendidas que incluyen la posibilidad de importar una historia de temperatura para predecir la vida útil restante con respecto a un organismo deteriorador específico, como es el caso del "Seafood Spoilage Predictor" (Dalgaard, 2002); o llegando hasta la incorporación de modelos predictivos en una red de evaluación de riesgos microbiológicos, como el "Salmonella enteritidis Risk Assessment" del USDA (Geeraerd, 2004).

2.6.2. Importancia de la microbiología predictiva

Los modelos matemáticos predictivos proveen información sumamente útil para tomar decisiones en determinadas situaciones. Estas situaciones pueden resumirse en (Whiting y Buchanan, 2001):

- En el desarrollo de productos, los modelos predictivos pueden permitir al productor evaluar la inocuidad y estabilidad de una nueva formulación e identificar aquellas que determinen la vida de anaquel deseada. En consecuencia, se puede utilizar el modelo predictivo para establecer inicialmente si el cambio afectará la estabilidad y vida de anaquel del producto.
- Predicción en seguridad y tiempo de vida útil: Crecimiento y supervivencia microbiana permiten estimar peligros potenciales provocados por microorganismos patógenos en alimentos luego de un normal o abusivo tiempo de almacenamiento.
- Control de Calidad: Los modelos pueden brindar ayuda en desarrollar programas HACCP mostrando que condiciones permiten crecer o sobrevivir y así identificar los puntos críticos de control.
- Desarrollo de nuevos productos; Cambios en la composición del alimento o una nueva formulación pueden ser rápidamente.
- Educación: a través de la generación de gráficos o estimando el tiempo de generación de una población microbiana crítica, los modelos permiten demostrar drásticamente la importancia de mantener la correcta temperatura o los beneficios que representa trabajar con materias primas de alta calidad con bajos contenidos microbianos iniciales.

2.6.3. Evaluación y validación de modelos

Ros (1996), propuso los factores de sesgo y de exactitud como medidas de mejora de los modelos matemáticos usados en la microbiología predictiva, con el objetivo de facilitar la evaluación de la fiabilidad de tales modelos. Del mismo modo el RMS, representa la idoneidad del modelo predictivo para describir los datos experimentales. Cuando el valor es más cercano a cero, mejor es el ajuste.

El aspecto fundamental para demostrar una predicción con exactitud es su validación, en tanto el valor máximo alcanzado por A_f significa menos exactitud en la estimación; es decir, un valor de A_f de 1,7 indica que las predicciones, en

promedio, difieren un 70% de las observaciones (valores experimentales). Si no hay desviaciones estructurales (sesgo = 1, ambas desviaciones positivas y negativas en promedio, modelo es exacto). La falta de exactitud puede ser mostrada por el Af (Baranyi et al., 1999).

2.7. Marco conceptual

2.7.1. Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

El término levadura se refiere a aquellos hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide o esferoide, y que se reproducen por gemación o por fisión. Presentan formas esférica, ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada. La especie *S. cerevisiae* se emplea en muchas industrias alimentarias, como en la fermentación del pan, fermentación de la cerveza, fermentación de los vinos, en la producción de alcohol, glicerol e invertasa. (International Commission on Microbiological, 2005).

2.7.2. Chicha de jora

La chicha de jora o Aqha en quechua, es una bebida fermentada oriunda de Sudamericana, para ser más detallados difundida en Perú, Bolivia y Ecuador. Presenta diversas variedades según la región donde lo preparan, pero la base de su preparación es principalmente la Jora o maíz malteado (Zapata, 2006).

2.7.3. Ultrasonido de potencia

El ultrasonido se refiere a ondas eléctricas en sólidos, líquidos y gases con frecuencias por encima de 20 kHz. El ultrasonido se divide en dos grupos: ultrasonido de alta intensidad (HIU) y ultrasonido de baja intensidad (LIU). HIU se aplica para modificar algún proceso mientras que el LIU es aplicado para monitorear un proceso o producto. HIU es aplicado a bajas frecuencias (20 - 300 kHz) para obtener niveles altos de potencia (10 - 1000 W/cm²). (Mulet, 2002).

2.7.4. Estabilización microbiológica

Capacidad para mantener los niveles microbiológicos después de que es expuesto a técnicas de conservación, simples o múltiples, para eliminar, reducir o prevenir el crecimiento microbiano. Entre los grupos de microorganismos que pueden

desarrollarse en un alimento se encuentran: bacterias y hongos, los cuales son capaces de multiplicarse en los alimentos y deteriorar el producto (Bhaduri, 1991).

2.7.5. Modelos cinéticos

Los modelos cinéticos estiman la respuesta de crecimiento específica, con respecto a diferentes variables de sobrevivencia (Van, 2017). Otras variables como la concentración gaseosa, el potencial de óxido- reducción, humedad relativa, contenido de nutrientes y propiedades antimicrobianas también pueden incluirse en los modelos cinéticos. Los modelos cinéticos son útiles y pueden utilizarse para predecir cambios en el número de microorganismos con respecto al tiempo, incluso cuando una variable que puede afectar al crecimiento esté cambiando. No obstante, estos modelos son laboriosos de construir puesto que requieren muchos datos de recuento microbiano (Gibson y col., 1988).

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

a. Localidad

La investigación se realizó en la Unidad Vecinal de Santa Rosa del distrito de Talavera, provincia de Andahuaylas, región Apurímac.

b. Institución

La investigación se ejecutó en los laboratorios de control de calidad de alimentos (Análisis espectrofotométrico y colorimétrico), biotecnología (Análisis microbiológico) y laboratorio de procesos agroindustriales (Elaboración de chicha de jora) de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional José María Arguedas (UNAJMA), ubicada en la Av. 28 de Julio Nro. 1103 del distrito de Talavera, provincia de Andahuaylas y región de Apurímac.

3.2. Material de estudio

El material de estudio está representado por chicha de jora en pleno proceso de fermentación producido en el laboratorio de procesos agroindustriales de la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional José María Arguedas.

3.3. Universo y/o población

La población estuvo representada por 5 L de chicha de jora producido en el tanque fermentador, instalada y acondicionada en el laboratorio de procesos agroindustriales.

3.4. Muestra

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia incluyendo todos los elementos disponibles. Para los tratamientos ultrasónicos se utilizaron 250 mL de chicha de jora previamente filtrado.

3.5. Equipos, materiales, instrumentos, reactivos e insumos

Los materiales empleados en el estudio de efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora se detalla en la Tabla 7.

3.5.1. Materiales

Tabla 7. Materiales requeridos para la ejecución de la investigación.

Unidad	Descripción	Marca
5 Und.	Pipetas de 5 mL	Fortuna
2 Und.	Matraz volumétrico de 200 mL	Fortuna
2 Und.	Pipeta de 1 mL	Fortuna
2 Und.	Tamiz 75 μ	s/m
2 Und.	Probetas de 250 mL	Fortuna
1 Und.	Bureta de 10 mL	Vrm
8 Und.	Erlenmeyer de 200 mL	Fortuna
8 Und.	Vaso de precipitados de 100 mL	Fortuna
4 Und.	Balón de 250 mL	Giardino
5 Und.	Pinza	s/m
5 und.	Nuez	s/m
2 Und.	Soporte universal	s/m
2 Und.	Pizeta	s/m
1 Und.	Embudo de vidrio	Fortuna
4 Und.	Luna de reloj	s/m
2 Und.	Pro pipeta	s/m
2 Und.	Espátula	s/m
8 Und.	Vaso precipitado de 100 mL	Fortuna
4 Und.	Placa Petri	Fortuna
10 Und	Porta objeto	s/m
30 Und	Cubre objeto	s/m
4 Und.	Gotero	s/m
2 Und.	Cámara de Neubauer	Improved

3.5.2. Equipos e Instrumentos

Los equipos e instrumentos empleados en el estudio de efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Equipos e instrumentos empleados en la investigación

Cantidad	Descripción	Marca
1	Estufa (incubadora a 10 - 80 °C)	MEMMERT
1	Termómetro digital (rango -50 hasta 300 °C)	WT1
1	Termocupla	s/m
1	Potenciómetro (Rango 0.0 – 14.0)	Hanna
1	Refractómetro (Rango 0-32%)	ATC
1	Alcoholímetro	s/m
1	Determinador de humedad	Aqualab
1	Refrigeradora (-10 hasta 8 °C)	Mabe
1	Colorímetro	Minolta CR- 400
1	Microscopio trilocular	Primo star
1	Agitador termo magnético	Lw-scientifique
2	Lavadora ultrasónica de 120 W a 40 y 42 kHz, capacidad de 450 mL.	Branson
1	Balanza analítica (Sensibilidad 0.001 g)	VE-303
1	Espectrofotómetro UV-Visible	Génesis
1	Triturador de alimentos	Wonder Max.
1	Cronometro	--

3.5.3. Insumos y reactivos

Los Insumos y reactivos empleados en el estudio de efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora se detalla en la Tabla 9.

Tabla 9. Insumos y reactivos requeridos en la investigación.

Cantidad	Insumos
01 L	Etanol al 95 %
50 mL	Ácido sulfúrico 0.36 N
50 mL	Cloruro de bario 0.048 M
10 g	Hidróxido de sodio 0.1 N
10 mL	Fenolftaleína al 1%
100 mL	Azul de metileno
500 g	Sacarosa
5 g	Ácido cítrico
1 L	Agua destilada

3.6. Metodología Experimental

La chicha de jora se elaboró en el laboratorio de física y procesos agroindustriales, los procesos se muestran en la Figura 6.

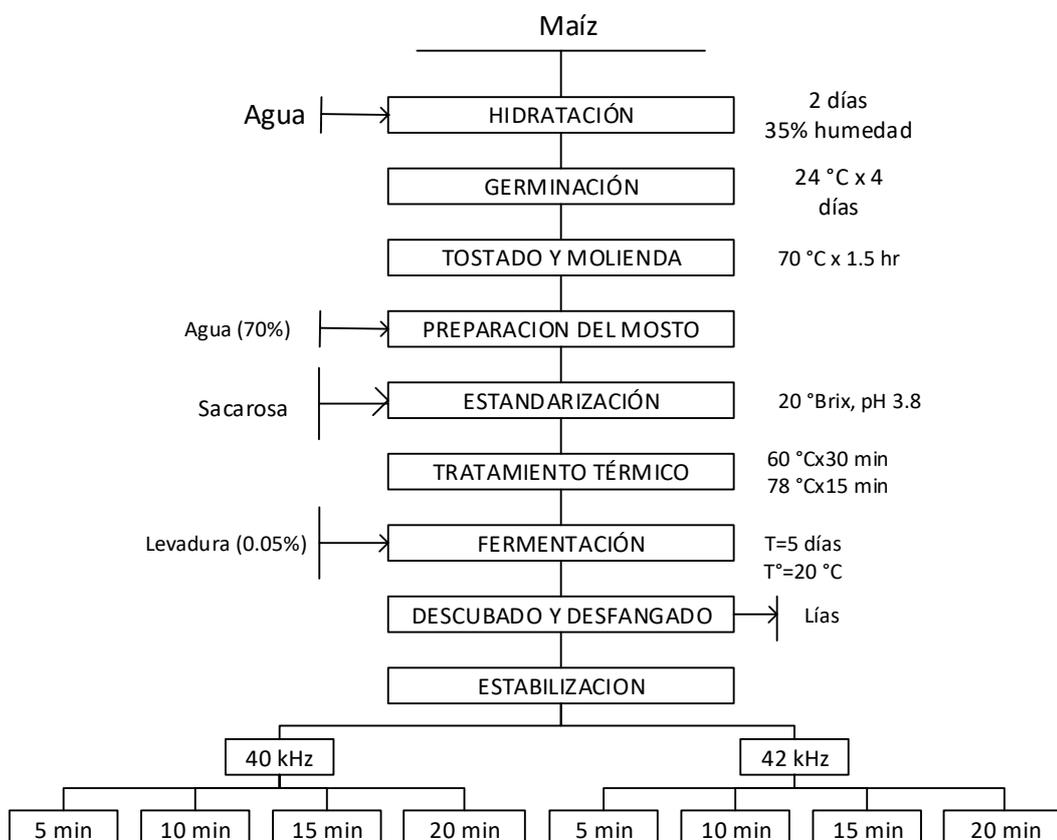


Figura 6. Diagrama de bloques de la elaboración de chicha de jora.

Fuente: Adaptado de Velásquez (1982).

3.6.1. Descripción de proceso de elaboración de chicha de jora

a. Materia prima

Se utilizó 250 g de maíz amarillo oro, procedente del distrito de Huancaray (cultivado a 2820 m.s.n.m. y coordenada decimal -13.740766,-73.555701.

b. Hidratación

Se remojó por inmersión en agua a temperatura de 15 °C por dos días, alcanzando una humedad de 35 %.

c. Germinación

Los granos de maíz fueron extendidos homogéneamente sobre una bandeja, posteriormente se depositó en una incubadora a temperatura constante de 24 °C por cuatro días, hasta alcanzar un tamaño de 2 cm de germen.

d. Tostado y molienda

El tostado se realizó en una estufa a 70 °C por 1.5 horas. Finalmente se realizó la fragmentación de los granos tostados con un triturador de alimentos modelo Wonder Max.

e. Preparación de mosto

Durante este proceso, fue necesario empezar con una maceración por tres horas en solución acuosa (70% de agua y 30% de jora) compuesta íntegramente por agua y jora previamente tostado y molturado para facilitar el hidrolisis de los azúcares

fermentables, dextrinas, proteínas, aminoácidos y otros elementos, disueltos en agua.

f. Estandarización

Proceso que comprendió en ajustar los niveles de pH: 3.8 con ácido cítrico, los sólidos solubles se estandarizaron a 20 °Brix empleando sacarosa.

g. Tratamiento térmico

Este proceso comprende el tratamiento térmico del mosto a una temperatura de 60 °C por un tiempo de 30 min, esto facilita la degradación de los almidones y azúcares complejos, del mismo modo eliminar las levaduras nativas presente en la chicha de jora. Posteriormente se ascendió progresivamente hasta alcanzar una temperatura de 78 °C por 15 min, con la finalidad de destrucción de los enzimas de la malta, esterilización del mosto, eliminación de los compuestos volátiles. El mosto es enfriado hasta una temperatura de 24 °C y finalmente se procedió a filtrar con un tamiz de 75 micras.

h. Fermentación

Para este proceso se acondicionó un fermentador (Anexo 12) a una temperatura de 20 °C y se inocularon levaduras nottingam de tipo alé que es altamente floculenta y mayor capacidad para descender y concentrar las lías en el fondo del tanque tras la consumación de la fermentación; dicho proceso fermentativo tomo un tiempo de 5 días bajo control en condiciones físicas.

i. Descubado

Al finalizar la fermentación se realizó el descube en frio, operación que consistió en separar la chicha de las lías acumuladas en el fondo de los depósitos trasegar un contenedor a otro con la finalidad de separar las lias. Es la forma de separar el vino limpio de las sustancias que le dan turbidez, y por lo tanto es el modo de limpiar la chicha de manera natural.

j. Estabilización

La estabilización microbiológica se realizó con dos lavadoras ultrasónicas de 40 y 42 kHz por diferentes niveles de tiempo 5, 10, 15 y 20 min (Anexo 14 y 15).

3.6.2. Análisis del efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica

El análisis de la estabilización de la chicha de jora, se basó en el estudio de inactivación de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a través del recuento de las UFC/mL y en propiedades turbimétrico.

a. Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC)

El recuento de las unidades formadoras de colonia se observó en microscopio electrónico bajo el uso de una cámara neubauer; para el cual, se empleó la metodología propuesta por Delfi (1995), lo mismo consistió en los siguientes procedimientos:

- Se tomó 10 uL de la mezcla preparada en el paso 1 con la micropipeta.
- Se colocaron aproximadamente 400 μ L de muestra homogeneizada en un micro tubo y se añaden 40 μ L de azul de metileno. La muestra y el colorante se mezclaron y se reposaron a temperatura ambiente durante 5 min.
- En seguida se sitúan la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de neubauer (Anexo 16 y 17).
- La cámara neubauer fue observada en el microscopio eléctrico y de acuerdo a las observaciones se fijaron las regiones de la cámara (Figura 7), posteriormente se calcularon las unidades formadoras de colonia a través de la ecuación 2.

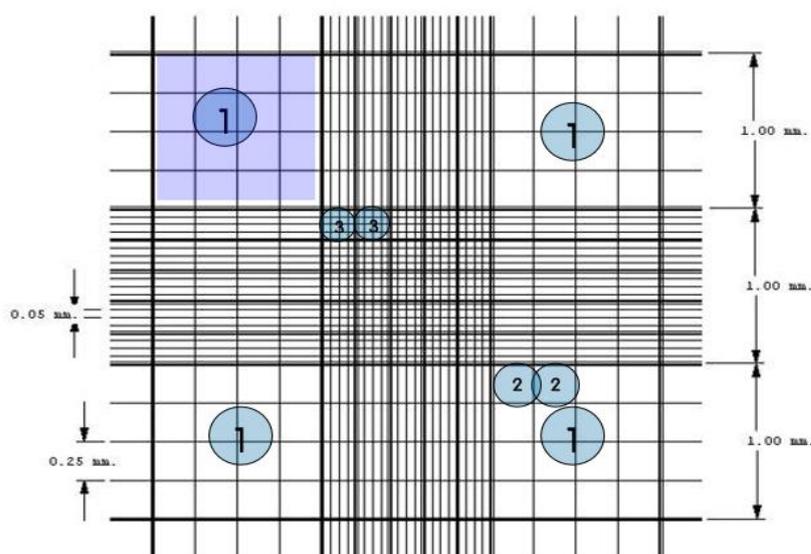


Figura 7. Regiones de conteo de microorganismos en la cámara de Neubauer improved.

Fuente: Delfi (1995).

$$\text{Área} = 0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} = 0.04 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volumen} = 0.04 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ mL}$$

$$\text{concentracion} = \frac{\text{Total células contadas}}{\text{Número de cuadrados}} \times 250000 \quad \text{Ecuación (3)}$$

b. Análisis de turbidimetría

Para la realización de la curva estándar de turbidez se trabajó con base en el método descrito por McFarland (1907).

En la realización de la escala patrón, se empleó ácido sulfúrico (H_2SO_4) y cloruro de bario (BaCl_2), posteriormente se mezclaron en una relación de volúmenes como se detalla en la Tabla 10.

Se realizaron las curvas de turbiedad empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm, cada una se las realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en unidades de absorbancia (Abs).

Tabla 10. Escala tradicional de turbiedad McFarland

Escala de McFarland	Concentración (células x 10^6) UFC/mL	BaCl_2 (0,048 M) (mL)	H_2SO_4 (0,36 N) (mL)
1	300	0.1	9.9
2	600	0.2	9.8
3	900	0.3	9.7
4	1200	0.4	9.6
5	1500	0.5	9.5
6	1800	0.6	9.4

7	2100	0.7	9.3
8	2400	0.8	9.2
9	2700	0.9	9.1
10	3000	1.0	9.0

Fuente: McFarland (1907).

3.6.3. Determinación de parámetros cinéticos de inactivación de levadura

A partir de los datos de inactivación obtenidos en los niveles de 40 y 42 kHz de frecuencias ultrasónico experimentadas y evaluadas en 5, 10, 15 y 20 min, se efectuaron simulaciones asistidas con un paquete informático CurveExpert.

La forma acumulativa de la distribución de Weibull:

$$N = N_0 e^{-b \cdot t^n} \quad \text{Ecuación} \quad (4)$$

$$\ln(N) = \ln(N_0) - (bt)^n \quad \text{Ecuación} \quad (5)$$

Dónde: N_0 y N representan a la concentración inicial y final de células; b y n son los factores de escala y forma respectiva; e Epsilon y t es el tiempo.

Ecuación modificada de Gompertz

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = C e^{-e^{-B(t-M)}} \quad \text{Ecuación} \quad (6)$$

Dónde: N_0 y N corresponden a la concentración inicial y final de células; C es la diferencia entre el valor más alto y más bajo de la asíntota y el signo menos significa inactivación de microorganismos; B es la velocidad de muerte relativa a tiempo de M , siendo M el tiempo en el cual la velocidad de muerte es máxima.

Modelo de Geerard

$$N(t) = (N_0 - N_{res}) * e^{-k_{max}t} * \left(\frac{e^{k_{max}S_1}}{1 + (e^{k_{max}S_1} - 1) * e^{-k_{max}t}} \right) + N_{res} \quad \text{Ecuación (7)}$$

Dónde: N (UFC/ml) representa la concentración final de células; N_0 (UFC/ml) es la concentración inicial de células; N_{res} es la concentración de células residuales (UFC/mL); k_{max} es la velocidad específica de inactivación (1/unidad de tiempo); S_1 es el parámetro que representa el hombro (unidades de tiempo); t es el tiempo (min).

3.6.4. Evaluación de los modelos

Los datos experimentales se modelaron con la ecuación modificada de Gompertz, Geeraerd y Weibull. La calidad del ajuste de los modelos propuestos se evaluó por medio del coeficiente de determinación R^2 (Ecuación 8), para conseguir un buen modelado de los datos experimentales y al RMS (desviación estándar de los residuales Ecuación 9).

$$\text{Correjido } R^2 = \left[1 - \frac{(n-1) \left(1 - \frac{SSQ_{regresion}}{SSQ_{total}} \right)}{(n-j)} \right] \quad \text{Ecuación (8)}$$

$$RMSE = SD = \sqrt{\frac{SSQ_{residual}}{(n-j)}} \quad \text{Ecuación (9)}$$

Dónde: n es el número de observaciones, j es el número de parámetros del modelo, SSQ es la suma de cuadrados, y SD o RMSE es la desviación estándar de los residuales (Reyns, 2000).

La caracterización de las curvas de inactivación se desarrolló graficando la evolución en la inactivación celular de las levaduras en función al tiempo de residencia en el ultrasonido. Para la validación de los modelos experimentales se recurrió al cálculo del factor de ajuste (A_f) y factor de exactitud (B_f) descrito por Ross (1996) y mostrados en la ecuacion 10 y 11 respectivamente.

$$A_f = 10^{\frac{\sum |\log(X_p/X_0)|}{n}} \quad \text{Ecuación (10)}$$

$$B_f = 10^{\sum \log(X_p/X_o)n} \quad \text{Ecuación (11)}$$

Dónde: n es el número de total de observaciones; Xp es el valor de predicho por los modelos de ciclos logarítmicos inactivados, y Xo es el valor observado o experimental. Un modelo validado de esta forma se considera como “seguro” cuando el valor de Bf es menor o igual a 1 (Af y Bf más cercanos de 1) (Ross, 1996).

3.6.5. Análisis estadístico

En el diseño experimental se estudiaron el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas (Figura 8), cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. El matriz de diseño factorial es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores (Gutiérrez, 2003). Se utilizaron el matriz de diseño o arreglo factorial de 2x4 con tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles de combinación de los niveles. Así, K= 2 factores y con dos niveles en el factor frecuencia ultrasónico y cuatro niveles en el factor tiempo.

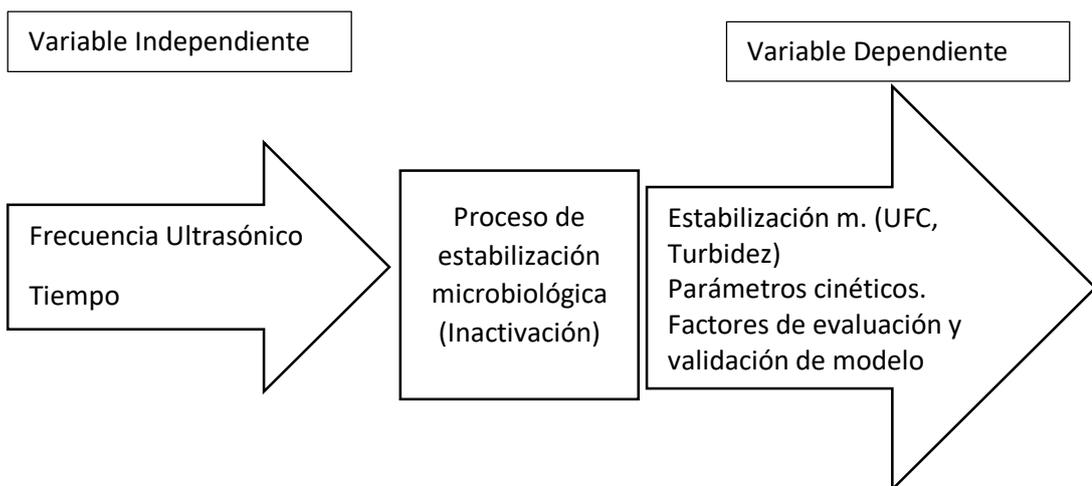


Figura 8. Diagrama de contrastación de variables.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 14. Matriz de diseño factorial mixto 2x4

Tratamientos	Frecuencia Ultrasónico (kHz)	Tiempo (min)	Estabilización microbiológica	
			UFC/mL	Turbidez (Abs)
1	40	5	Y_{U11}	Y_{T11}
2	40	10	Y_{U12}	Y_{T12}
3	40	15	Y_{U13}	Y_{T13}
4	40	20	Y_{U14}	Y_{T14}
5	42	5	Y_{U21}	Y_{T21}
6	42	10	Y_{U22}	Y_{T22}
7	42	15	Y_{U23}	Y_{T23}
8	42	20	Y_{U24}	Y_{T24}

Dónde: $Y_{U_{xn}}$ representa a las unidades formadoras de colonia (UFC/mL) bajo la combinación de frecuencia ultrasónico y tiempo, $Y_{T_{xn}}$ representa la turbidez bajo la combinación de frecuencia ultrasónico y tiempo.

3.6.6. Análisis del diseño factorial mixto

El modelo estadístico para el diseño factorial mixto está dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{Ecuación (12)}$$

Donde:

Y_{ijk} : Inactivación microbiológica y Turbiedad de la i observación bajo la combinación del j valor de la frecuencia ultrasónico, k valor del tiempo.

μ : es la media general.

α_i : El efecto de i nivel de la variable de tratamiento A.

β_j : El efecto de j nivel de la variable de tratamiento B.

$(\alpha\beta)_{ij}$: Representa al efecto de interacción entre i del valor A y j del valor B.

ε_{ijk} : Es el error aleatorio

Donde:

A: Frecuencia ultrasónico

B: tiempo de tratamiento

UFC/mL: concentración de unidades formadora de colonia en un mililitro

Prueba de Hipótesis

Para la prueba de hipótesis se estimó las siguientes hipótesis:

a. Frecuencia ultrasónica

H₀: Efecto A=0; La frecuencia ultrasónica no afecta en la inactivación.

H_A: Efecto A≠0; La frecuencia ultrasónica afecta en la inactivación.

H₀: Efecto A=0; La frecuencia ultrasónica no afecta en la turbidez.

H_A: Efecto A≠0; La frecuencia ultrasónica afecta en la turbidez.

b. Tiempo

H₀: Efecto B=0; El tiempo de tratamiento no afecta en la inactivación.

H_A: Efecto B≠0; El tiempo de tratamiento afecta en la inactivación.

H₀: Efecto B=0; La frecuencia ultrasónica no afecta en la turbidez.

H_A: Efecto B≠0; La frecuencia ultrasónica afecta en la turbidez.

c. Interacción frecuencia ultrasónica x tiempo

H₀: Efecto AB=0; la frecuencia ultrasónica x tiempo de tratamiento no afecta en la inactivación.

H_A: Efecto AB≠0; la frecuencia ultrasónica x tiempo de tratamiento afecta en la inactivación.

H₀: Efecto AB=0; la frecuencia ultrasónica x tiempo de tratamiento no afecta en la turbidez.

H_A: Efecto AB≠0; la frecuencia ultrasónica x tiempo de tratamiento afecta en la turbidez.

Análisis de varianza

De acuerdo a la prueba de normalidad descrita en el Anexo 6, se utilizó estadística paramétrica en su efecto análisis de varianza (Tabla 11).

Tabla 11. ANOVA para un diseño factorial.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	F0	Valor-p
Efecto A	SC_A	a-1	CM_A	$\frac{CM_A}{CM_E}$	P(F>F ₀ ^A)
Efecto B	SC_B	b-1	CM_B	$\frac{CM_B}{CM_E}$	P(F>F ₀ ^B)
Efecto AB	SC_{AB}	(k-1)(b-1)	CM_{AB}	$\frac{CM_{AB}}{CM_E}$	P(F>F ₀ ^{AB})
Error	SC_E	ab(n-1)	CM_E		
Total	SC_T	abn-1			

Fuente: Gutiérrez (2003).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica en la inactivación microbiológica

4.1.1. Análisis de unidades formadoras de colonia (UFC)

El análisis de inactivación microbiológica (Tabla 6) muestra el resultado de la variabilidad del número de células (*Saccharomyces cerevisiae*) supervivientes después del tratamiento ultrasónico, en ello se observa que una frecuencia mínima de trabajo (40 kHz) es capaz de reducir 0.70 ciclos logarítmicos en 20 minutos; del mismo modo con una mayor frecuencia ultrasónica (42 kHz) se obtuvo una reducción de 0.64 ciclos logarítmicos en el mismo intervalo de tiempo.

Tabla 6. Análisis de inactivación de unidades formadoras de colonia

	Frecuencia ultrasónico			
	40 kHz		42 kHz	
TIEMPO	\bar{X} Log(UFC/mL)	S	\bar{X} Log(UFC/mL)	S
5 min	6.32	± 0.03	6.07	± 0.06
10 min	6.17	± 0.02	5.99	± 0.01
15 min	6.06	± 0.06	5.90	± 0.10
20 min	5.88	± 0.00	5.79	± 0.04

De acuerdo a la curva de inactivación microbiológica de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 9) bajo el efecto del tratamiento ultrasónico a 40 kHz muestra una fracción logarítmica inicial de 6.32, en los primeros minutos de tratamiento se experimenta una tendencia a la reducción cuasi vertical posteriormente se observa una inflexión en la curva para mantener una tendencia uniforme de reducción o inactivación que concluye en una fracción logarítmica de 5.88 a los 20 min. Mientras a una frecuencia ultrasónica de 42 kHz se muestra una tendencia a la reducción pronunciada siendo 6.07 ciclos logarítmicos en los primeros 5 minutos, posteriormente una inflexión en la curvatura indica la reducción a una fracción logarítmica de 5.79 a los 20 min de tratamiento; del mismo modo haría falta de una reducción de 5 ciclos logarítmicos para lograr una esterilidad comercial (Anexo 11).

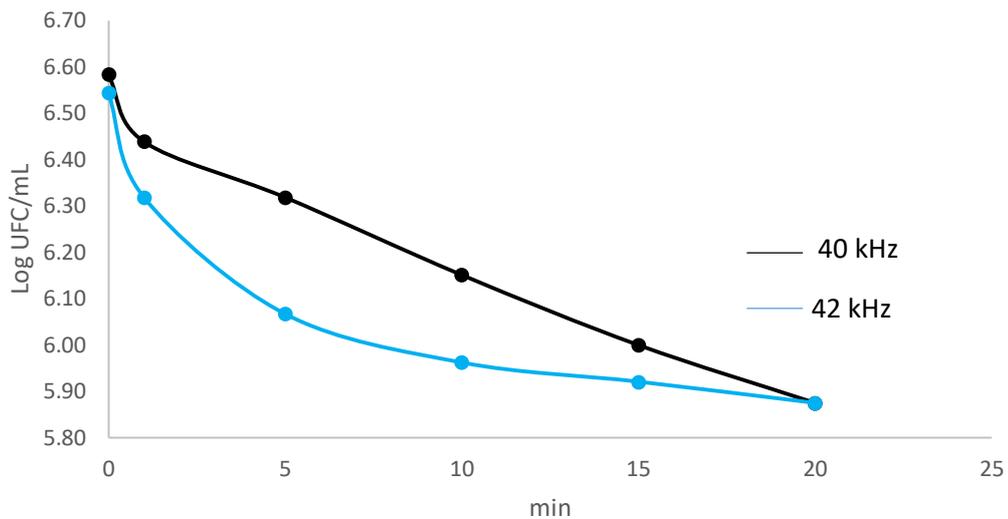


Figura 9. Curva de inactivación microbiológica de *Saccharomyces cerevisiae* a 40 y 42 kHz de tratamiento.

Según a las dos curvas de inactivación (Figura 9), la inactivación microbiológica está en función al tiempo de tratamiento ultrasónico, lo que permite corroborar la efectividad de dicho proceso en términos de inactivación. Del mismo modo Oscar et al., (2011) reporta que la carga disminuye significativamente al aumentar el tiempo de exposición, siendo más efectivos los tratamientos a 25 kHz, en los cuales se obtienen reducciones de hasta un 54.7 % (después de 60 min de tratamiento). Tiempos iguales de exposición a la mayor frecuencia (de menor intensidad), logran disminuir la carga hasta en un 46.97 %. Del mismo modo Mejía (2012), determinó la cinética de inactivación tratamientos ultrasónicos con frecuencia de 24 kHz y amplitud de 120 μm , fueron efectivos para reducir la concentración celular *S. cerevisiae*, en 1,1 ciclos logarítmicos en 10 min. De acuerdo a la intensidad del tratamiento se correlacionan también los daños que pueden ser o no reparados por las células. El choque osmótico ocasiona cambios rápidos de movimiento de agua a través de las membranas con extrusión del contenido periplásmico (Schleyer, 1993).

Mañas y Pagan, (2005) reportaron que la disminución de carga microbiana debido al ultrasonido sigue la misma tendencia en los primeros minutos, periodo en el que se presenta la mayor disminución de la población tanto para *Escherichia coli* (1.77 ciclos logarítmicos) como *Staphylococcus aureus* (0.66 ciclos logarítmicos), además las bacterias presentan esporas más resistentes que las levaduras, la

pared celular de las bacterias Gram (+) tienen más rigidez que las bacterias Gram (-) (Colwell y Grimes, 2000).

Herrero y Romero, (2006) señalan que la muerte celular se debe a la cavitación. Del mismo modo Joyce *et al.*, (2003) sostiene que fenómeno de cavitación causa el colapso violento de burbujas que liberan toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneo y focal, el choque mecánico. Por lo tanto, la rupturas y adelgazamiento de las membranas celulares, y el stress por un periodo de tiempo dependiendo de la frecuencia son los factores de la muerte celular (Entezari *et al.*, 2004). En bacterias Gram negativas se altera la permeabilidad de la membrana externa promoviendo la salida de proteínas periplásmicas al medio externo permitiendo identificar agregados de proteínas intracelulares desnaturalizadas (Chen *et al.*, 2004).

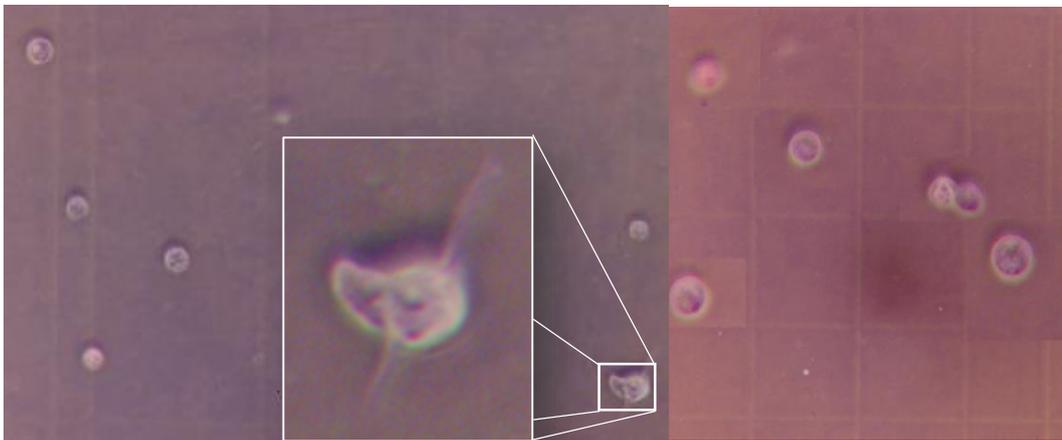


Figura 10. Micrografía de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* a mil aumentos, tras el tratamiento ultrasónico.

Según la figura 10, se muestra una lisis celular tras el tratamiento o exposición ultrasónico, el cual evidencia la pérdida de la forma original de la levadura y la ruptura en la membrana Celular citoplasmática, una estructura fina que rodea completamente a la célula. Es una estructura vital de tan sólo unos 8 nm, la ruptura de la membrana afecta la integridad de la célula liberándose al medio los componentes que la integran y produciéndose la muerte celular o autólisis. (Madigan, 2004). Esto significa la pérdida irreversible de su potencial reproductivo (desarrollo y división) (Colwell, 2000).

Por otra parte, hay células que no fueron afectadas por el ultrasonido y que conservan su integridad biológica, ya que hay una parte de ellas que sobreviven,

lo cual se debe a que una parte de los sólidos suspendidos de la muestra tratada por ultrasonido funcionan como un escudo para los microorganismos (Karel, 2003).

Tabla 7. Análisis de Varianza para UFC en chicha de jora.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Frecuencia Ultrasónico	0.19	1	0.17	84.75	0.00
B:Tiempo	0.42	1	0.41	196.61	0.00
AB	0.02	1	0.02	8.09	0.01
Error total	0.04	19	0.01		
Total (corr.)	0.65	23			

En la Tabla 7, se muestran los resultados de análisis de varianza para la estabilización microbiológica en la chicha de jora; dichos resultados muestran que la frecuencia ultrasónica (A) y el tiempo (B) poseen efecto significativo al 95 % de nivel de confianza ($P < 0.05$) sobre la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*. Del mismo modo, la interacción de los factores tiempo y frecuencia ultrasónico (AB) tienen un efecto significativo en la inactivación; por tanto, se rechazó la hipótesis nula (H_0) para admitir la hipótesis alterna (H_a).

Cox (2002), reportó el efecto de ultrasonido combinado con agentes desinfectantes en la inactivación de *Salmonella typhimurium* presente en alimentos minimamente procesados (Frutas y hortalizas). En ello se logró una reducción de hasta 2.7 ciclo logarítmicos en un tiempo de 10 min y en un rango de frecuencia de 32 – 40 kHz.

Por otra parte Ortuño (2014), aplicó ultrasonido de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos, en ello la viabilidad de las levaduras comenzó a decaer rápidamente después de 1 min. Después de 0.5 min de tratamiento, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la cinética de inactivación a las 100 y 350 bar, después de 2 min de tratamiento, la inactivación total (7 ciclos logarítmicos). Esta reducción se efectúa en un periodo de tiempo muy corto evidenciando una mayor efectividad del proceso denominado manosonicación (Knor *et al.*, 2004).

Los tiempo de inactivación y la sensibilidad a las diferentes frecuencias ultrasónicas, se debe al tipo de microorganismo, ya que algunos pueden ser más susceptible al ultrasonido, en general se ha visto que las células largas o más

grandes son mas sencibles al ultrasonido, por que a mayor tamaño hay mayor area de superficie de las celulas y los mismos reciben mayor presion de cavitacion, finalmente convirtiendose en el mas vulnerable (Mason, 1998). La radiación ultrasónica ha demostrado tener una potencia alta para ser usada en la inactivación de poblaciones bacterianas (Piyasena *et al.*, 2003).

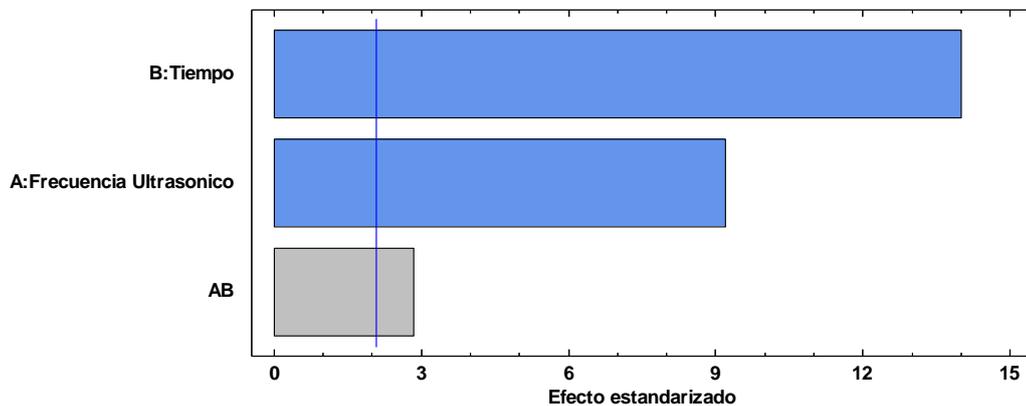


Figura 11. Diagrama de Pareto para inactivación microbiana.

En la Figura 11, se muestra que el factor tiempo de exposición (B) tiene mayor influencia frente a la frecuencia ultrasónica (A), del mismo modo la interacción de los factores (AB) afecta en la inactivación, mientras el efecto cuadrático de los factores posee influencias no activas (Anexo 5). El parámetro crítico de inactivación es el tiempo de exposición, se demuestra que a mayor tiempo de exposición, habrá mayor inactivación microbiana. Por otra parte, la inactivación efectuada con ultrasonido evidencia una relación entre la carga de levadura sobrevivientes (UFC/mL) y el tiempo de tratamiento (Mañas & Pagan, 2005).

La predominancia de los factores en el rol de inactivación también está determinada por el nivel del ultrasonido, como lo registraron Joyce *et al.*, (2003) al usar frecuencias de 850 kHz y compararlas con 38 kHz siendo las primeras notablemente influyentes (Raso *et al.*, 1998).

4.1.2. Análisis de turbidimetría

La escala tradicional McFarland representado en la Figura 12, se construyó mediante el análisis turbidimétrico en precipitado de sulfato de bario (Ácido sulfúrico y cloruro de bario), dicha curva de calibración relaciona la absorbancia con las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

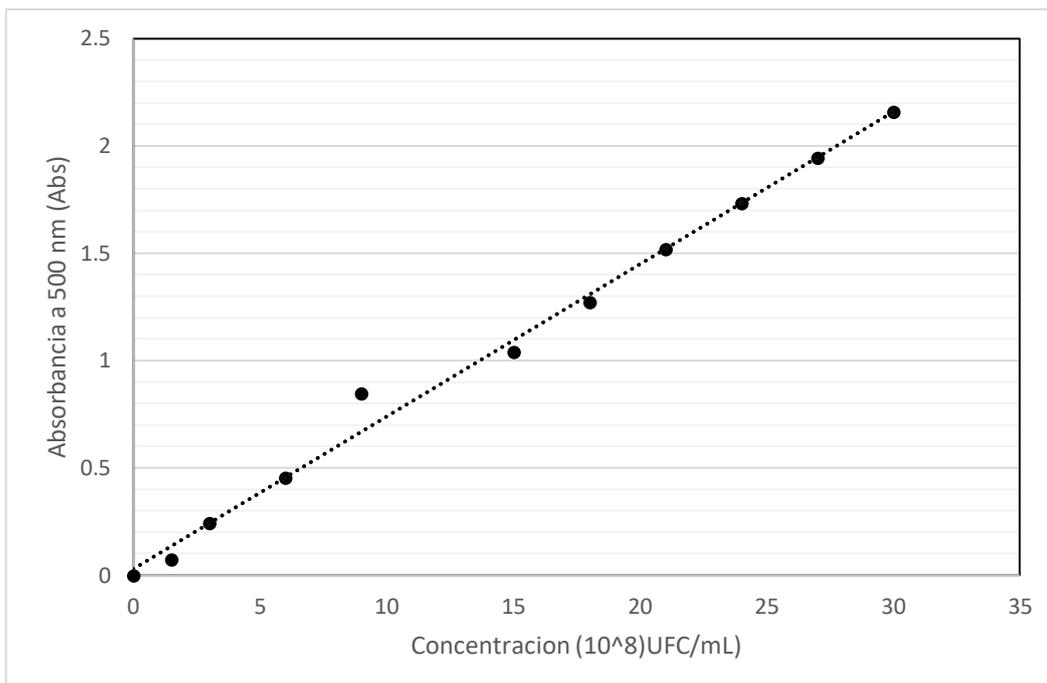


Figura 12. Estimación de la concentración de *Saccharomyces cerevisiae* basado la escala de McFarland.

La figura permitió determinar la ecuación lineal (Tabla 8) para la interpolación de la concentración celular del microorganismo estudiado (*Saccharomyces cerevisiae*).

Tabla 8. Ecuación de linealidad obtenida del ensayo espectrofotométrico

Pendiente	0.0711
Ordenada en el origen	0.0277
Ecuación lineal	$Y_{Abs} = 0.0711Abs/ufcml^{-1}x + 0.0277_{Abs}$
Ecuación de Interpolación	$UFC/mL=(Abs-0.0277)/0.0711$
Coefficiente de correlación	0.993

De acuerdo a la Figura 13, se muestran los resultados de inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* determinadas bajo criterios de turbidez; en ello se determinó la reducción en la densidad óptica o turbiedad (Anexo 2); por consiguiente, la curva de inactivación evidencia una pendiente hacia la disminución de la fracción logarítmica. De acuerdo a los resultados espectrofotométricos el nivel de turbiedad al termino del tratamiento ultrasónico a 40 kHz es de 0.11 Abs (6.028 ciclos logarítmicos) del mismo modo a un

tratamiento de 42 kHz se estimó una turbiedad de 0.08 Abs (5.92 ciclos logarítmicos).

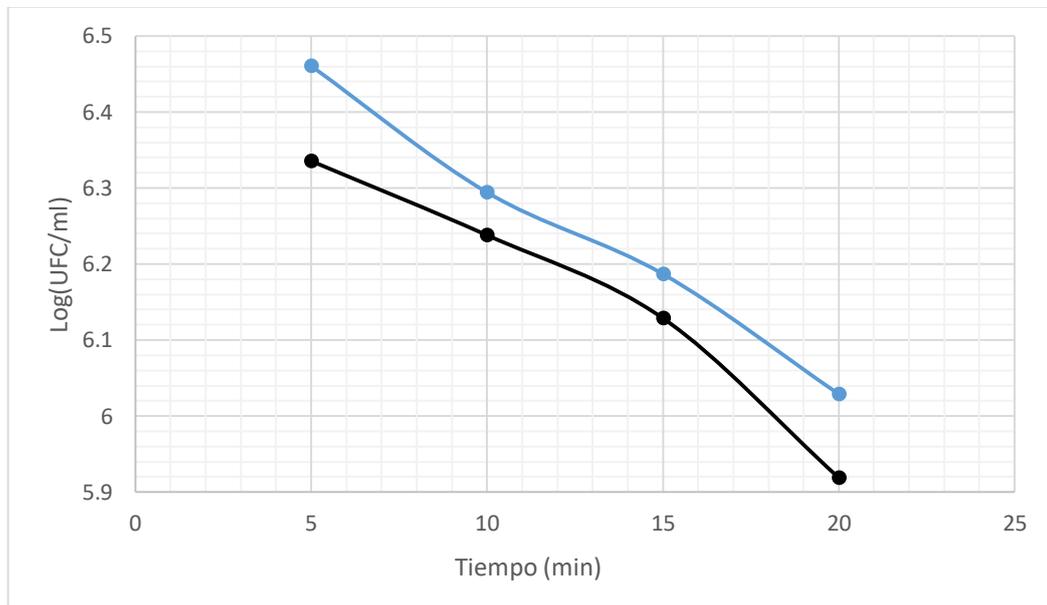


Figura 13. Curva de inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* a 40 y 42 kHz de tratamiento ultrasónico.

La turbiedad, muestra una correlación con la presencia de unidades formadores de colonia, siendo mayor la absorción de la luz; por lo tanto, a mayor densidad óptica hay mayor población de levaduras en la chicha de jora. Así los diferentes autores mencionan que la reducción de la intensidad de luz transmitida es consecuencia de la difracción de la luz por parte de las células. (Rattanasomboon, 1999). Así, la turbidez en las bebidas se debe a las siguientes causas: biológica, coloidal y una química, ésta última debido a diversos agentes como el oxalato de calcio (Ros, 1980). Según Clerck (1957), la descomposición biológica no es la única causa de deterioro, también lo es la turbidez coloidal.

Según y Whiteley, (2004) reportan una absorbancia de 0.200 correspondiente a una población de 2×10^8 UFC/mL en el crecimiento de *P. fluorescens* en un caldo nutritivo estéril, por otra parte (Quevedo, 1987) reporto la turbidez visible en el crecimiento de bacterias (*Enterobacter aerogenes* y de *Staphylococcus epidermidis*) en soluciones salina al 0.85%, dextrosa al 5 %, manitol al 20 %, su máxima concentración alcanzada espectrofotométricamente fueron valores hasta de 0.015 de absorbancia equivalente a una población superior de 1×10^6 UFC/mL.

Los altos niveles de turbidez que se reportan, está asociada a la saturación del medio de crecimiento. Esta saturación pudo ser provocada por una mala sedimentación de levaduras en la etapa de reposo, ya que según lo señalado por Doyle et al. (1997), un contenido de 1×10^5 UFC/mL de levadura forma turbidez. Al respecto hay que señalar que se ha establecido que el contenido de levadura es una de las variables más determinantes en el rendimiento de la filtración y por consiguiente en la densidad óptica. Además la absorbancia varía en función al tipo de microorganismo de estudio, ello podría deberse al tamaño, la levadura $100 \mu\text{m}$ - $10 \mu\text{m}$ mientras de los bacterias $5 \mu\text{m}$ - $0.2 \mu\text{m}$ (Matthews y Maxwell, 2007).

En la Tabla 9, se muestran los resultados de Análisis de Varianza (ANOVA) para la densidad óptica, según a dicha tabla el Valor – P de la frecuencia ultrasónica y tiempo de tratamiento es menor al nivel de significancia (0.05), en tanto dichos factores influyen en la densidad óptica de la chicha de jora, con un nivel del 95.0 % de confiabilidad. Asimismo, la interacción de tiempo y frecuencia ultrasónica tiene efecto significativo.

Tabla 9. Análisis de Varianza para turbiedad.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Frecuencia Ultrasónico	0.01	1	0.01	28.89	0.00
B:Tiempo	0.04	1	0.04	305.05	0.00
AB	0.00	1	0.00	7.42	0.01
Error total	0.00	19	0.00		
Total (corr.)	0.04705	23			

En la Figura 14 se observa el diagrama de Pareto, en ello el factor tiempo posee mayor influencia en comparación a la frecuencia ultrasónico, además la interacción AB influye sobre la turbidez.

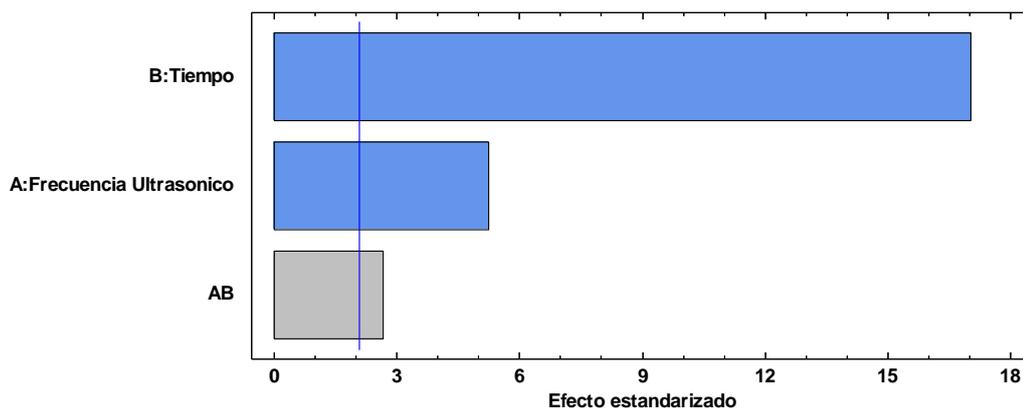


Figura 14. Diagrama de Pareto para turbidez de chicha de jora.

De acuerdo a los efectos principales (Anexo 7), a mayores niveles en tiempos de exposición y en frecuencia ultrasónica (42 kHz) se observa mayor efecto sobre la turbidez. La interacción de frecuencia ultrasónica y tiempo determinan la muerte celular y los mismo implica la reducción en la biomasa microbiana y por consecuencia en la turbidez. Esto se puede explicar frecuentemente por el fenómeno de refracción, cuando el haz de luz pasa por una celda que contiene partículas dispersas con un índice de refracción diferente del medio, la intensidad del haz saliente de la celda es menor debido al efecto de la dispersión. Las diferencias encontradas en la cinética de las fermentaciones a escala de laboratorio y piloto pueden estar relacionadas con variaciones en el comportamiento de la levadura debido a la dificultad para promover una adecuada agitación durante la toma de muestras y la sedimentación celular (Gomes, 2010).

4.2. Determinación de parámetros cinéticos de inactivación de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

De acuerdo a los resultados del recuento microbiano (Tabla 10) se desarrolló modelos matemáticos basados en el modelo Weibull, Gompertz y Geerard propuestos en las ecuaciones 4, 5 y 6.

Tabla 10. Recuento microbiano de unidades formadoras de colonia a diferentes tiempos de tratamiento.

TIEMPO	Frecuencia ultrasónica			
	40 kHz		42 kHz	
	Log (UFC/mL)	s	Log (UFC/mL)	s
0 min	6.58	±0.00	6.54	±0.02
5 min	6.32	±0.03	6.06	±0.06
10 min	6.15	±0.02	5.96	±0.01
15 min	6.06	±0.06	5.92	±0.08
20 min	5.88	±0.00	5.88	±0.04

La curva de inactivación obtenidas a una frecuencia de 40 kHz de exposición se distingue por una curva de sobrevivencia cuasi – lineal; esto explica la sensibilidad de la levadura a factores de cavitación generada a una frecuencia de 40 kHz, ya que la mayoría de bacterias son capaces de crecer a presiones de hasta 20 - 30 MPa, presiones superiores a esta inducen cambios de tipo morfológico, bioquímico y genético, que tienen en la membrana y la pared celular de los microorganismos (Raventos, 2003).

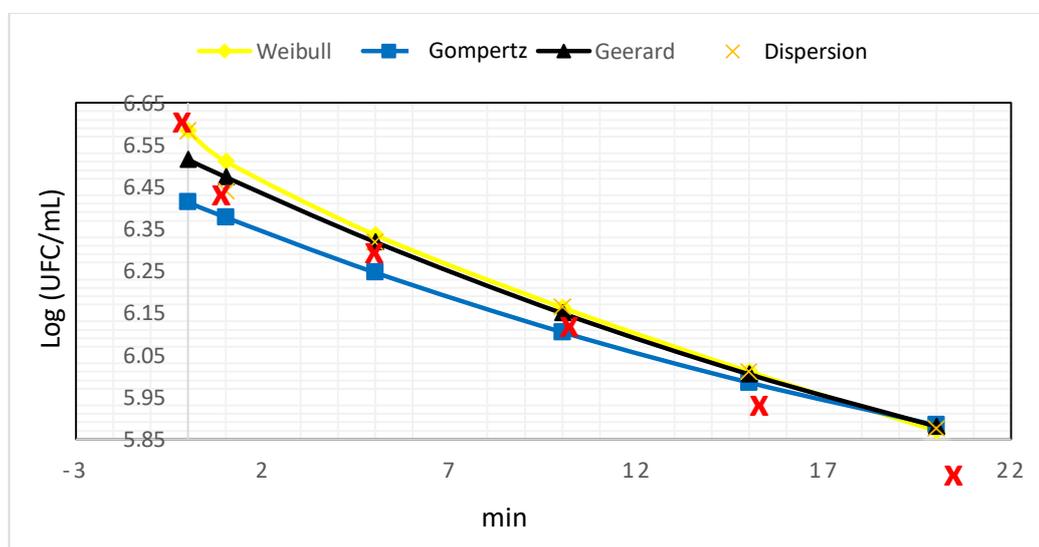


Figura 15. Curvas de inactivación descritos por la distribución de Weibull, ecuación modificada de Gompertz y Geerard a una exposición de 40 kHz.

De acuerdo a la Figura 15 los modelos microbiológicos predictivos generan distribuciones similares para la concentración final de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la media 5.88 log UFC/mL; mientras la distribución de concentración inicial

defiere, el modelo Gompertz muestra valores inferiores debido a que el modelo toma en consideración la concentración máxima de microorganismos que alcanzan en la fase inicial de inactivación.

Según la Figura 16, de curvas de sobrevivencia de *Saccharomyces cerevisiae*, se denota por una mayor tasa de muerte durante los primeros 3 minutos. A esta frecuencia ultrasónica los resultados de la distribución de Weibull, Gompertz y Geerard describen una cola que representa a las células sobrevivientes con mayor resistencia o tal vez son las que se adaptaron al medio y a la temperatura elevada provocada por la cavitación. Ortuño (2014), aplicó ultrasonido de potencia, en ello la variabilidad de las levaduras comenzó a decaer rápidamente después de 1 min. Después de 2 min de tratamiento, la inactivación total se estimó en 7 ciclos logarítmicos.

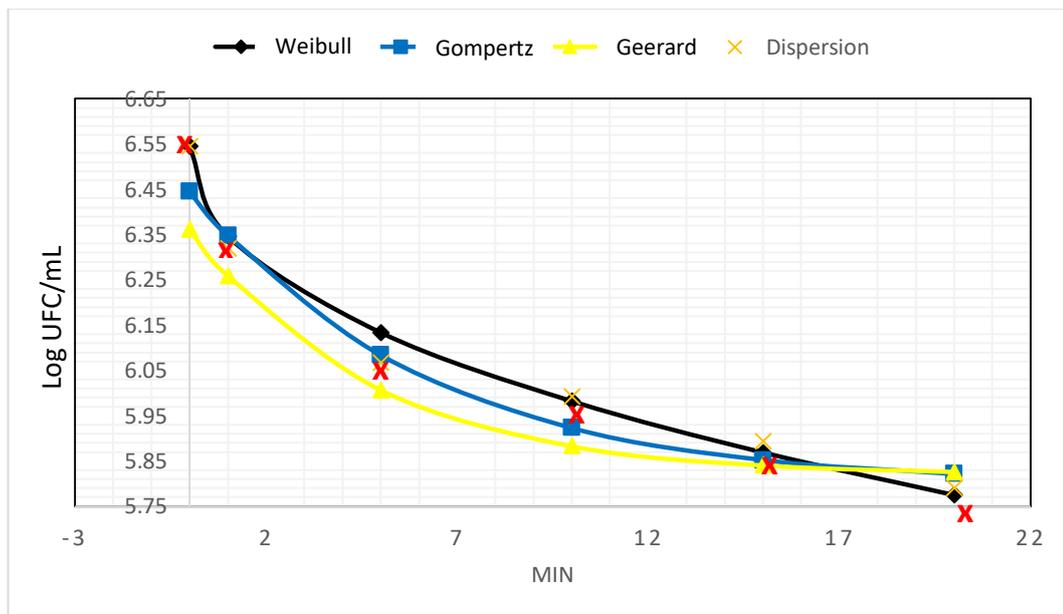


Figura 16. Curvas de inactivación descritos por la distribución de Weibull, ecuación modificada de Gompertz y Geerard a una exposición de 42 kHz.

Las curvas de inactivación a 42 kHz de exposición ultrasónica (Figura 16) muestran una tendencia diferente de la forma lineal, se observan fenómenos de cola, dicha forma no-lineal es comúnmente observada en estudios de inactivación de los microorganismos (Bacterias y levaduras) la explicación física de este fenómeno es definida como la presencia de células remanentes después del tratamiento (Buzrul *et al.*, 2008).

Coroller et al., (2012), afirman que las células sobrevivientes presentan una mayor resistencia al tratamiento aplicado y una probabilidad muy baja de morir. Mientras una fracción de la población superviviente en su proceso de adaptación al medio, se puede volver más sensible, y por lo tanto el daño acumulado provocado haría que las bacterias no sobrevivan.

La forma cóncava en la curva de inactivación es provocada por la intervención de los otros factores (amplitud de onda ultrasonido), esto concuerda con lo postulado por (Lee *et al.* 2009) quien afirma que un agente letal está involucrado en un proceso de inactivación, por lo que se observan diferentes curvas de tipo no lineal, siendo indicativo de la existencia de población microbiana con diferente resistencia a los agentes letales. Asimismo, cada célula de la población se encuentra en un estado fisiológico diferente que determina el tiempo que va a tardar en inactivarse.

Parámetros cinéticos de inactivación

Tras las regresiones no lineales se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos (Tabla 11) para los modelos Weibull (b: Factor de escala y n: Factor de forma), Gompertz modificado (C: Diferencia entre el valor más alto y el más bajo de la asíntota, B: Velocidad de muerte relativa UFC/min y M: tiempo en el cual la velocidad de muerte es máxima) y Geerard (K: velocidad específica de inactivación, S: Parámetro que representa el hombro y N: Es la concentración de células residuales), para cada nivel de frecuencia ultrasónico.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de los modelos predictivos de inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Modelo	Trat.	Parámetros cinéticos		
Weibull	40 KHz	b=0.0724 ± 0.0113		n=0.7639 ± 0.0527
	42 KHz	b =0.1984 ± 0.047		n =0.4526 ± 0.0998
Gompertz modificado	40 KHz	C=11.4319±1.976	B=0.0364 ± 0.005	M=-18.4696± 0.9189
	42 KHz	C=9.6212± 2.198	B=0.1671±0.0297	M=-15.9306± 4.3291
Geerard	40 KHz	K _{max} =0.0393±0.006	S ₁ =-17.9968± 7.8972	N _{res} =5.2522± 0.0816
	42 KHz	K _{max} =0.217±0.0874	S ₁ =-10.3233±4.2363	N _{res} =5.8188± 0.0409

Dónde: b (log UFC/mL min⁻¹); C (log UFC/mL); B (Log UFC/mL min⁻¹); M (min); K_{max} (log UFC/mL min⁻¹); S₁ (min).

La distribución de Weibull corresponde a una curva cóncava, dado que n (0.76 y 0.45) < 1 (Peleg y Cole, 1998). El factor de forma (n) es inferior a 1 lo que indica que hay una determinada proporción de células en la población que son muy sensibles, quedando las más resistentes para los tiempos finales en los que estas células resistentes van muriendo lentamente. La forma cóncava es resultado del daño progresivo en cada pared celular provocado por un agente inactivante, que no son letales pero que se van acumulando hasta alcanzar un número suficiente de ellos que provocarían la muerte, en general el proceso de inactivación de muchos microorganismos no sigue un comportamiento lineal (Peleg y cole. 1998). Ávila, (2013) señala que la distribución de Weibull toma su importancia por su sencillez y su capacidad de modelar curvas de supervivencia.

De acuerdo al modelo Gompertz modificado para una frecuencia de tratamiento 40 kHz se estimó una velocidad de muerte relativa (B) de 0.036 Log (UFC/mL) min, alcanzando una máxima velocidad de muerte a los 18 minutos; mientras a una frecuencia de 42 kHz se estimó una velocidad de muerte relativa (B) de 0.167 log(UFC/ml) min a una velocidad máxima alcanzada a los 15.8 minutos.

Valbuena (2005) demostró que modelo primario utilizando la ecuación de Gompertz permite ajustar mejor una curva de inactivación. Mientras el modelo de Gompertz modificado, inicialmente descrito para curvas con forma sigmoideas asimétricas de crecimiento (Zwietering *et al.*, 1990), luego este modelo no lineal fue demostrado para curvas de inactivación en *L. monocytogenes* Scott en leche para lactantes Linton *et al.*, (1995) presenta hombros y colas, por lo que no es el modelo que más se ajusta a los resultados obtenidos.

4.3. Evaluación de los modelos

Las evaluaciones comparativas del ajuste de los modelos predictivos empleados en esta investigación se efectuaron a través del cálculo del coeficiente de determinación (R^2) y la desviación estándar de los residuos (RMSE). La representación del ajuste proporcionado por cada modelo se puede observar en la Tabla 12; en el cual, el modelo de Weibull se ajusta mejor a los datos experimentales ya que a valores pequeños de RMSE y valores cercanos a 1 de R^2 indican buena calidad del ajuste ($R^2 = 0.974$ y $R^2 = 0.985$ para 40 y 42 kHz), seguido de modelo Geerard ($R^2 = 0.852$ y $R^2 = 0.953$) y finalmente por la ecuación de Gompertz modificado ($R^2 = 0.970$ y $R^2 = 0.856$ para 40 y 42 kHz).

Tabla 12. Coeficiente de determinación (R^2), desviación estándar de los residuos (RMSE) para los tres modelos propuestos.

F. Ultrasonico	Weibull		Gompertz		Geerard	
	R^2	RMSE	R^2	RMSE	R^2	RMSE
40 kHz	0.974	0.041	0.852	0.057	0.970	0.040
42 kHz	0.985	0.034	0.953	0.056	0.856	0.72

Para evaluar la capacidad de un modelo para predecir la respuesta de los microorganismos bajo ciertas condiciones del entorno (McMeekin et al., 1993), a efectos de profundizar la comparación de los modelos se recurrió a la validación de los modelos a través del cálculo del factor de ajuste (A_f) (ecuación 9) y factor de exactitud (B_f) (ecuación 10). Los valores obtenidos se representan en la Tabla 13; muestran al modelo Weibull con un error mínimo en la predicción (A_f : 1.004), lo cual indica cuanto difiere la predicción del modelo de los datos observados. Ortuño (2014), determino que el modelo Weibull y la función Gompertz se adaptaron satisfactoriamente a la cinética de inactivación de *E. coli* y *S. cerevisiae*. Las principales ventajas del modelo basado en la distribución de Weibull es la sencillez y su capacidad de modelar curvas de supervivencia (Ávila, 2013).

Tabla 13. Factor de Ajuste (A_f) y factor de exactitud (B_f) para cada modelo matemático.

F. Ultrasonido	E. Weibull		Gompertz Modificado		M. Geerard	
	A_f	B_f	A_f	B_f	A_f	B_f
40 kHz	1.004	1.001	1.012	0.988	1.005	0.997
42 kHz	1.004	1.001	1.008	0.996	1.014	0.989

En cuanto al factor de exactitud el modelo Weibull (B_f : 1.004) es el modelo más conveniente y seguro al predecir la respuesta de la inactivación bacteriana a los dos niveles de tratamiento ultrasónico, seguido por el modelo Gompertz Modificado (B_f : 0.988 y B_f : 0.996 para 40 y 42 kHz respectivamente); lo mismo es evidenciado en la simulación de las curvas con mayor ajuste (Anexo 9). Valbuena (2005), aplicó un modelo cinético al crecimiento de *Lactococcus lactis subsp. lactis*; en ello se estimaron los principales parámetros que describen el crecimiento microbiano (tiempo de adaptación, tasa máxima de crecimiento exponencial y tiempo de generación).

CONCLUSIONES

- De acuerdo a las evaluaciones, a niveles altos en frecuencia ultrasónica y tiempo de tratamiento (40 kHz; 20 min) se logró inactivar hasta fracción logarítmica de 5.88 UFC/mL, de la población de *Saccharomyces cerevisiae*.
- El estudio del efecto de aplicación de frecuencia ultrasónica en la inactivación de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a través del recuento directo de UFC y turbidimetría demuestran, que la frecuencia ultrasónica y el tiempo de tratamiento son factores que afectan en la inactivación.
- Los parámetros cinéticos de inactivación se determinaron a partir de los modelos Gompertz modificado, Geerard y Weibull siendo este el último con mejores propiedades de ajuste en sus parámetros factor de escala (b) y factor de forma (n).
- La cinética de inactivación microbológica de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se modelizaron bajo los modelos: Weibull, Gompertz y Geerard a 40 y 42 kHz de frecuencia ultrasónica, siendo el primero el más adecuado para describir las curvas de inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*, presenta las mejores relaciones estadísticas $R^2 = 0,979$, $RMSE = 0,038$ y mejores indicadores de validación de modelo $A_f = 1,004$ y $B_f = 1,001$.

RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto de los ultrasonidos de alta potencia para su implementación a nivel industrial, como una alternativa de estabilización microbiológica en los procesos de fermentación alcohólicas.
- Para lograr mayor efectividad en la estabilización y recortar los tiempos de proceso se recomienda el uso del ultrasonido combinado con otros factores inactivadores de microorganismos, como lo es la presión, rayos UV y temperaturas moderadas.
- Realizar análisis de microscopia SEM para cualificar a nivel intracelular del *Saccharomyces cerevisiae* el efecto del ultrasonido.
- Realizar un estudio para determinar la influencia del ultrasonido en las propiedades sensoriales y enzimáticas de la chicha de jora.
- Por su calidad de ajuste, utilizar el modelo Weibull para curvas de inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* tratados por ultrasonido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, H. (2009). Propuesta de una receta estándar para la elaboración de la chicha en la provincia de Chimborazo. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito Ecuador.
- Álvarez, I., & Mañas, P. (2005). Inactivación microbiana con ultrasonido. España: Food En: Technology University of Zaragoza.
- Ávila, P. A. (2013). Evaluación de la supervivencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus* en una sopa utilizando la distribución de Weibull. México: Revista CienciaUAT.
- Ayma, G. C. (2012). Tratamiento térmico para estabilizar la chicha de jora. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería.
- Bajaj, A. N. (1991). Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients : a comprehensive review. *Journal of Excipients and Food Chemistry*.
- Baranyi, J. y T. A. Roberts (1994). Dynamic approach to predicting the bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol United States: Journal of Excipients and Food Chemistry*.
- Bhaduri, J. (1991). Métodos bacteriológicos estándar. United States: *Journal of Excipients and Food Chemistry*.
- Briggs et al., (2004). ciencia y práctica en fermentación. Inglaterra: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Buzrul S., Alpas H., Largeteau A. and Demazeau G. (2008). Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk. *Eur. Food Res.*
- Cárcel, J. A. (2003). Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de material. España.
- Casolari, A. (1988). Physiological models in microbiology. *International Journal of Food Microbiology*.

- Chen, G. and Campanella, O. H. (2012). An optimization algorithm for estimation of microbial survival parameters during thermal processing. *International Journal of Food Microbiology*.
- Chuchuca, A. D. (2012). Implementación validación de una metodología económica para la medición del color aplicada en los alimentos. Ecuador.
- Colwell, R. Grimes J. (2000). Semantics and strategies Non-culturable microorganisms in the environment. Ed. Colwell RR and Grimes J, American Society for Microbiology Press, Washington.
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., and Mafart, P. (2006). General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Coroller, L. (2012). Modelling of growth, growth/no-growth interface and nonthermal inactivation áreas of *Listeria* in foods. *International Journal of Food Microbiology*.
- Correa, E. (2004), Series de tiempo: conceptos básicos, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de matemáticas, Medellín.
- Cox, D. R. (1984). Analisis de supervivencia . London: Chapman & Hall.
- Dalgaard P. (2002). *Introductory Statistics with R. Statistics and Computing*. Springer-Verlag.
- Delfi, C. (1995). Ciencia y tecnica de microbiologia enologica. *International Journal of Food Microbiology*.
- Doyle M., Beuchat L. & Montville T. 1997. *Microbiologia de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Editorial acribia. Zaragoza-España.
- Dukhin, A., Goetz, P. y. (2005). uso del ultrasonido para caracterizacion de los productos . *Dairy Science*.
- Entezari, M. H. and Petrier, C., (2004). A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-enzyme degradation of phenols in a mixture. *Ultrason. Sonochem*.

- Farkrudin, B., Vijaykumar, Krishnareddy, K.B., Patil, B.V. and Kuruvinashetty, M.S. (2011). Status of insecticide resistance in geographical populations of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* in South Indian Cotton Ecosystem.
- Fernández, J. (2001). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. United States: CSIC.
- Ferreira A, et al. (2010) Optimización de la preparación de mosto de miel y fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de hidromiel. *Int J Food Microbiol*.
- Feuillat, M. (1998). *Enologie. Fondements scientifiques et technologiques*. Paris.
- Forsythe, F. (2002). *The microbial risk assessment of foods*. Oxford, UK: Blackwell.
- Garcia, L. G. (2009). Inactivation of naturally occurring microorganisms in liquid whole egg using high pressure carbon dioxide processing as an alternative to heat pasteurization.
- García-Palazón A., (2004) The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry. *Food Chemistry*.
- Geeraerd, J. V. (2004). Freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. Belgica: *Int. J Food. Microbiol*.
- Gibson y col. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry.
- Gigliarelli, P. (2013). Fermentación. *International Journal of Food Microbiology*.
- Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Morais, J., & Ramalhosa, E. (2010). *International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-industry*.
- Gonzales K. (2009). El empleo del ultrasonido en el tratamiento de aguas residuales. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas Cuba*.

- Gougouli, M. and Koutsoumanis, K. P. (2012). Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*.
- Gutierrez, H. (2003). *Analisis y diseño de experimentos*. Mexico, Ed. McGrawHill.
- Hammond, J. (2000). Yeast growth and nutrition. En *Brewing Yeast Fermentation Performance* (págs. 77–85). Oxford, UK: Blackwell Science.
- Harrigan W.F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3rd Ed. Academic Press, San Diego. Technical fact sheet No 8. Laboratory testing.
- Herrero, A., & Romero, R. (2006). *Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas*. Madrid.
- Hoover, G. (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. *Ultrasound, journal of food Science Supplement*.
- Hough, J. S. (1990). *Biología de la cerveza y de la malta*. España: Acribia.
- Huang, K., (2012). A review of kinetic models for inactivating microorganisms and enzymes by pulsed electric field processing.
- International Commission on Microbiological. (2005). *microorganismos en los alimentos*. Chapman & Hall.
- Joyce, E. Mason, TJ, Phull, SS y Lorimer, JP (2003). El desarrollo y la evaluación de la electrólisis junto con el ultrasonido de potencia para la desinfección de suspensiones bacterianas. *Ultrason Sonochem*.
- Karel, S. (2003). *The immobilization of whole cells: engineering principles*. Chemical Engineering Science.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci*.
- Kremkau EP, (2002) Ultrasonic detection of cavitation at catheter tips. *Am J Roentgenol*.
- Kunze, W. 2006. *Tecnología para cerveceros y malteros*. Primera edición, Alemania.

- Lebert I., Robles-Olvera V., Lebert A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas* spp. and *Listeria* in meat. *International Journal of Food Microbiology*.
- Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H., & Martin, S. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication. *Journal of Food Engineering*.
- Lempriere, B. M. (2002). *Ultrasonido y ondas elasticas*. USA: Academic Press.
- León, L. 2010. Proyecto de prefactibilidad para una planta productora de Chicha de Jora. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Linton, D. (1997). Detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrhoeic samples. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Madigan, M. T. (2004). *Biología de los microorganismos*. Pearson Prentice Hall.
- Manrique de Sáenz (1978). Flora Microbiana de la Chicha de Jora y Fermentación Experimental de la Levadura Seleccionada. Tesis de grado, programa de Farmacia de la UNMSM, Lima-Perú.
- Mañas, P., & Pagan, R. (2005). Review Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*.
- Matthews, T.R.; Maxwell, K.E. (2007). Growth and mortality of captive caribbean spiny lobsters, *Panulirus argus*, in Florida, USA. Gulf and Caribbean Fisheries Institute.
- Mason, T. (1998). Power ultrasound in food processing the way forward. EE.UU.
- Mc Farland, J. (1907). El nefelómetro instrumento para estimar el número de bacterias en suspensiones utilizadas para calcular el índice opsónico y para vacunas. *Journal of the American Medical Association*.
- Mejía, A. (2012). Evaluación del efecto de factores intrínsecos de una matriz líquida sobre la inactivación microbiana mediante la aplicación de ultrasonido de alta intensidad. Ecuador : Dspace.
- Ministerio de salud. (2002). *Tablas Peruanas de composición de alimentos*. Lima.

- Mulet, A. (2002). Aplicacion del ultrasonido de alta potencia en los alimentos . Inglaterra.
- Ortuño, M. (2004). Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos, universidad politécnica de valencia. España.
- Ortuño, M. (1996). Física para biología, medicina, veterinaria y farmacia. España: nuevos instrumentos universitarios.
- Oscar, O., Gerardo, G., & Alberto, C. (2011). Efecto de la aplicacion de ondas de ultrasonido sobre la propiedades fisicoquímicas, reológicas y microbiológicas de pulpa de mango . Ecuador.
- Peleg, M. and Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. Artículo de revisión. Food Sci. Nutrition.
- Piyasena, E. M. (2003). Inactivacion de microorganismos utilizando ultrasonido . International Journal Of Food Microbiology.
- Price, P., & Frey, K. B. (2003). Microbiology for surgical technologists. Clifton Park, NY: Delmar Learning.
- Povey, M. J. (1998). Alimentos y ultrasonido . United States: Contemporary Physics.
- Quevedo, A. (1987). Determinacion del crecimiento bacteriano en soluciones parentales y demostracion de la presencia de endotoxina. Mexico.
- Quillama, E. (1998). Producción de bacteriocinas por cepas de Lactobacillus. Lima.
- Raso J. (1998). Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juice by pulsed electric fields.
- Raventos, M. (2003). Industria alimentaria tecnologías emergentes. Universidad Politécnica de Catalunya.
- Reich, J. B. (2000). Invertase activity in fresh and processed honeys. Sci. Food Agriculture.
- Reyns, C. S. (2000). Analisis cinético y modelado de temperatura y alta presión . Journal food microbiology .

- Rivas Serna, I. (2007). Ultrasonido en los Procesos de Conservación de Alimentos Líquidos-Edición Única. Mexico.
- Roels, J. A., Kossen, N. W. F. 1978 On the modelling of microbial metabolism. In: Progress in Industrial Microbiology, V. Amsterdam: Elsevier.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food.
- Santamaria, M. (1997). Biología y Botánica de hongos. International Journal of Food Microbiology.
- Schleyer M., Schmid R., Bakker EP. 1993. Transient specific and extremely rapid release of osmolytes exposed to hypoosmotic shock.
- Sataniel R. (1989). An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh Apple juice. J. Pediatr.
- Tienungoon, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. Appl. Environ. Microbiol.
- Van Impe, J.F (2017). Introducing a novel interaction model structure for the combined effect of temperature. International Journal of Food Microbiology.
- Velásquez, M. (1982). Determinación de los parámetros para la elaboración de jora, a partir del maíz Cancha de Huaraz. Lima: Universidad Agraria La Molina.
- Valbuena, E. B. (2005). Modelos genéticos aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche. Perú: Revista científica Alicia - Concytec.
- Varnam, J. P. (1997). Bebidas alcohólicas: Cerveza. Bebidas. Tecnología, Química y Microbiología.). España: Acribia.
- Whiteley, M. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments, Mol Microbiol.
- Whiting, R. C. y Buchanan, R. L. (2001). Predictive microbiology and risk assessment. En M. P. Doyle. Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology.
- Zagzebski J. A. (1996). Fundamentos de la física de ultrasonido USA. Elsevier Science.

Zapata, S. (2006). Diccionario de cocina gastronomía peruana tradicional. Lima: San marcos.

Zwietering, MH, I. Jongenburger, (1990). Modelización de la curva de crecimiento bacteriano. Apl. reinar. Microbiol.

ANEXO

Anexo 1. Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	DEFINICION DE OPERACIÓN Y RECOLECCION DE DATOS						
	PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLE	DIFINICION	DIMENS ION	INDICA DOR	VALORE S ESC.	DISEÑO O MÉTODO	INSTRUME NTO
EFECTO DE LA APLICACIÓN DE FRECUENCIA ULTRASONICO Y TIEMPO EN LA ESTABILIZACION MICROBIOLÓGICA DE CHICHA DE JORA	¿Cuál es el efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónica y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora?	Evaluar el efecto de la aplicación de frecuencia ultrasónicas y tiempo en la estabilización microbiológica de chicha de jora.	La frecuencia de ultrasonido y tiempo afectan en la estabilización microbiológica de chicha de jora	Frecuencia ultrasónico y Tiempo	Se refiere a la frecuencia y tiempo de tratamiento	Análisis físico	40, 42 kHz 5, 10, 15 y 30 min	kHz Min	Experimental Experimental	Tina ultrasónica Cronómetro
	¿Cómo afecta la aplicación del frecuencia ultrasónico y tiempo en la inactivación de levadura?	Determinar el efecto de la aplicación del frecuencia ultrasónico y tiempo en la inactivación de levadura.	La frecuencia de ultrasonido y tiempo afectan en la inactivación de levadura	Inactivación UFC/mL Turbidez	Se refiere a la inactivación microbiológica de la levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) y turbidez	Análisis físico Análisis físico	UFC/mL ABS	UFC ABS	Experimental Experimental	Cámara Neubauer Espectrofotómetro UV-Visible
	¿Cuáles son los parámetros cinéticos de los modelos Weibull, Gompertz y Geard?	Determinar los parámetros de los modelos Weibull, Gompertz y Geard en la cinética de inactivación	Es posible determinar parámetros del modelo Weibull Gompertz y Geard en la cinética de inactivación	Parámetros cinéticos	Se refiere a parámetros del modelo matemático de inactivación	Análisis descriptivo	Weibull (b y n) Gompertz (C, B, M) Geard (S,n, k)	B, t	Descriptivo	CurveExpert
	¿Cual es el modelo matemático de la cinética de inactivación?	Modelizar y evaluar la cinética de inactivación de levadura a 40 y 42 kHz de frecuencia ultrasónica.	Los modelo Weibull, Gompertz y Geard poseen mayor propiedad de ajuste.	Factores de evaluación y validación	Se refiere a los indicadores de ajuste de los modelos	Análisis descriptivo	R ² , RMSE A _f y B _f	B, t	Descriptivo	CurveExpert

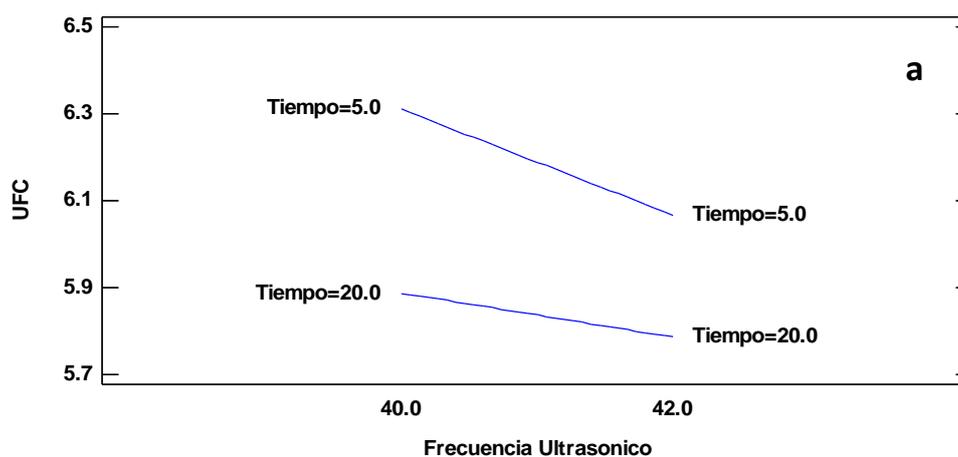
Anexo 2. Análisis espectrofotométrico

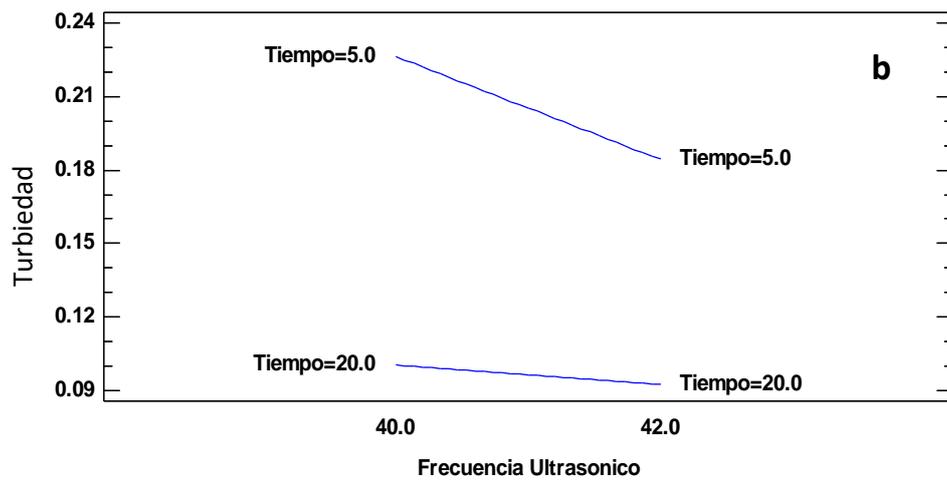
Tiempo	Frecuencia ultrasónico			
	40 kHz		42 kHz	
	ABS	s	ABS	s
5 min	0.2330	±0.0154	0.1817	±0.0166
10 min	0.1677	±0.0045	0.1507	±0.0006
15 min	0.1370	±0.0062	0.1233	±0.0040
20 min	0.1037	±0.0055	0.0867	±0.0058

Anexo 3. Análisis colorimétrico de la chicha de jora

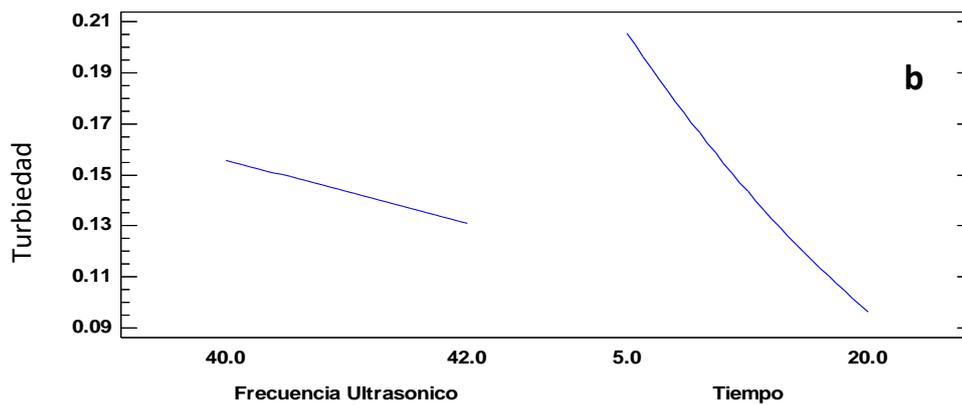
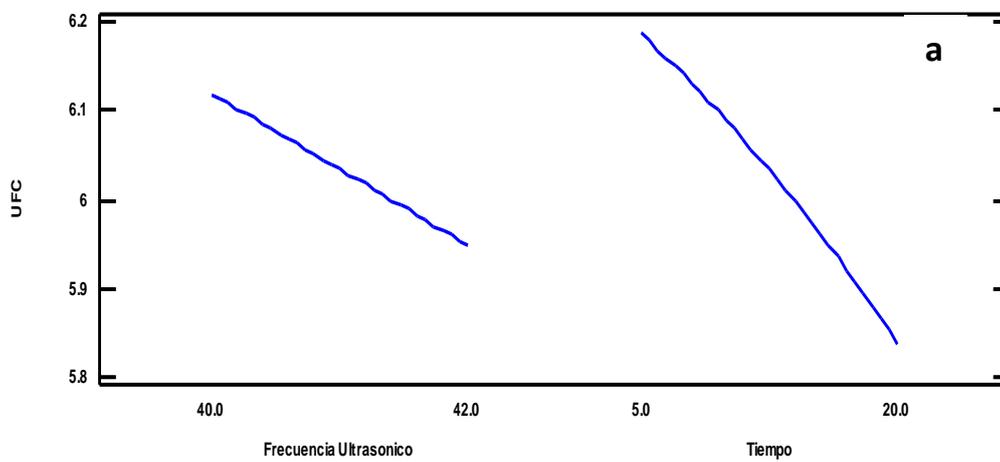
Frecuencia ultrasónico (kHz)	Tiempo (min)	Colorimetría		
		L^*	a^*	b^*
40	5	23.55	1.29	-1.81
	10	23.18	1.76	-1.67
	15	25.32	1.22	-3.23
	20	26.05	1.24	-3.12
42	5	25.17	1.09	-3.34
	10	26.11	1.08	-3.34
	15	25.87	1.17	-3.32
	20	26.21	1.08	-3.26

Anexo 4. Gráfico de interacción: Inactivación UFC (a) y turbiedad (b).





Anexo 5. Gráfico de efectos principales: Inactivación UFC (a) y turbiedad (b).



Anexo 6. Prueba de normalidad basado en Shafiro – Wilk

Prueba de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Log						
(UFC/ml)	0.136	24	0.200*	0.956	24	0.363
Abs	0.103	24	0.200*	0.955	24	0.352

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

Significancia log (UFC/mL) $0.363 > 0.05$ / Significancia Abs $0.352 > 0.05$; los datos poseen una distribución normal.

Anexo 7. Test LSD Fisher (UFC)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,14488

Error: 1,7500 gl: 16

FRE	Medias	n	E.E.	
40,00	13,54	12	0,38	A
42,00	8,75	12	0,38	B

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,61910

Error: 1,7500 gl: 16

TEMP	Medias	n	E.E.	
5,00	16,25	6	0,54	A
10,00	11,67	6	0,54	B
15,00	9,83	6	0,54	C
20,00	6,83	6	0,54	D

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,28976

Error: 1,7500 gl: 16

FRE	TEMP	Medias	n	E.E.	
40,00	5,00	20,83	3	0,76	A
40,00	10,00	14,17	3	0,76	B
42,00	5,00	11,67	3	0,76	C
40,00	15,00	11,67	3	0,76	C
42,00	10,00	9,17	3	0,76	D
42,00	15,00	8,00	3	0,76	D E
40,00	20,00	7,50	3	0,76	D E
42,00	20,00	6,17	3	0,76	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 8. Test LSD Fisher (DO)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00782

Error: 0,0001 gl: 16

FRE	Medias	n	E.E.	
40,00	0,16	12	2,6E-03	A
42,00	0,14	12	2,6E-03	B

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01106

Error: 0,0001 gl: 16

TEMP	Medias	n	E.E.	
5,00	0,21	6	3,7E-03	A
10,00	0,16	6	3,7E-03	B
15,00	0,13	6	3,7E-03	C
20,00	0,10	6	3,7E-03	D

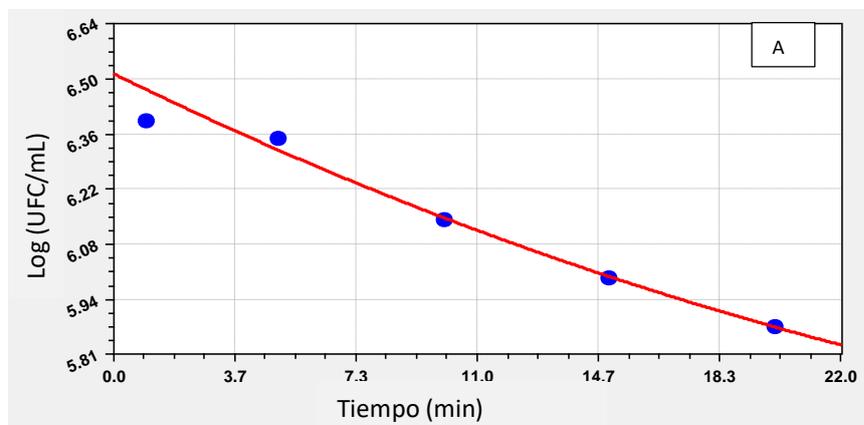
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01564

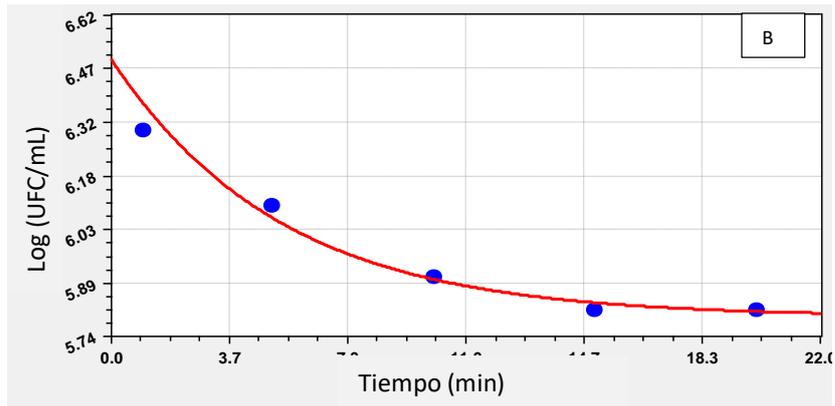
Error: 0,0001 gl: 16

FRE	TEMP	Medias	n	E.E.	
40,00	5,00	0,23	3	0,01	A
42,00	5,00	0,18	3	0,01	B
40,00	10,00	0,17	3	0,01	B
42,00	10,00	0,15	3	0,01	C
40,00	15,00	0,14	3	0,01	C D
42,00	15,00	0,12	3	0,01	D
40,00	20,00	0,10	3	0,01	E
42,00	20,00	0,09	3	0,01	F

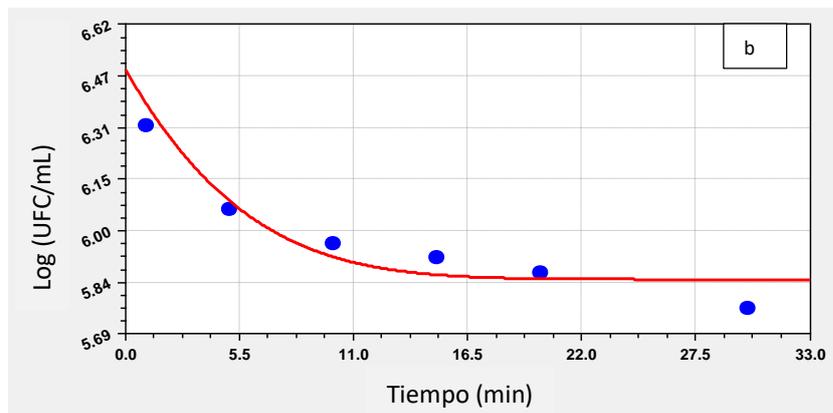
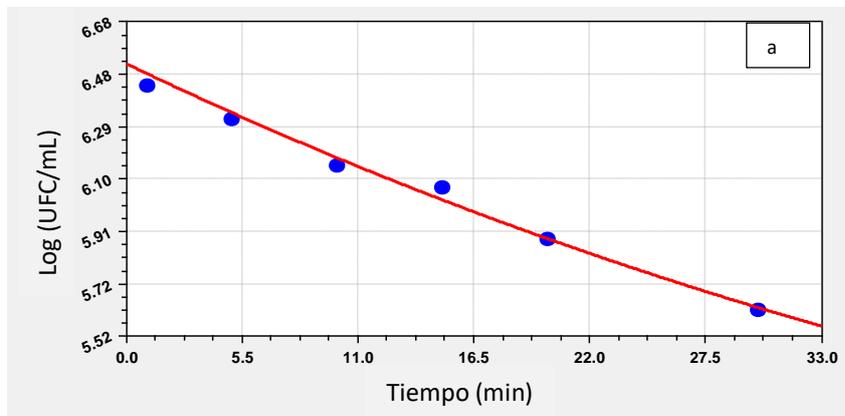
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 9. Simulación de curvas de inactivación ajustados en CurveExpert

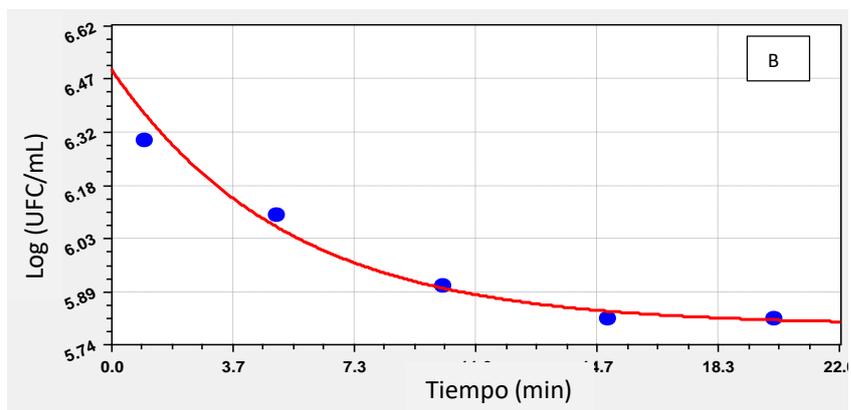
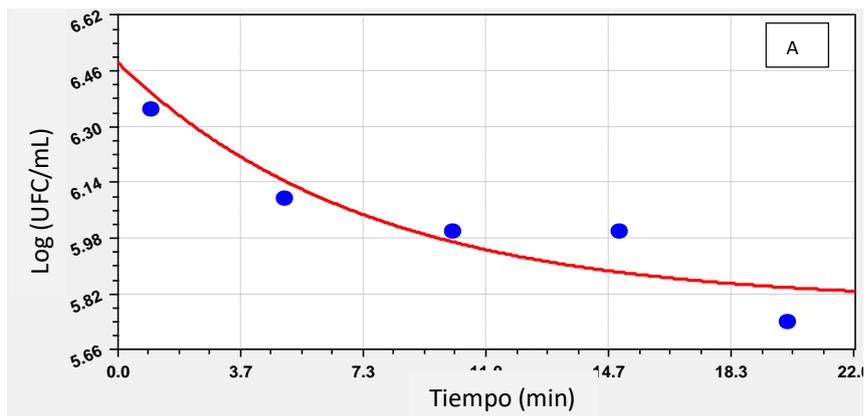




Leyenda: A y B representan la simulación de las curvas de inactivación bajo el modelo de Gompertz a 40 kHz y 42 kHz respectivamente.



Leyenda: a y b representan la simulación de las curvas de inactivación bajo el modelo de Weibull a 40 kHz y 42 kHz respectivamente



Legenda: A y B representan la simulación de las curvas de inactivación bajo el modelo de Geerard a 40 kHz y 42 kHz respectivamente

Anexo 10. Norma sanitaria de criterios biológicos de bebidas no carbonatadas.

Bebidas no carbonatadas.						
Agente microbiano	Categoría	Clases	n	c	Limite por mL	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10	10 ²
Mohos	2	3	5	2	1	10
Levaduras	2	3	5	2	1	10
Coliformes	5	2	5	0	< 3	----

Dónde: n: Número de unidades de muestra, c: Número máximo permitido, m: Limite microbiológico que separa la calidad aceptable de lo rechazable y M: Valores superiores a "M" son inaceptables.

Fuente: DIGESA (2008).

Anexo 11. Panel fotográfico de germinación del maíz, para la producción de jora.



Anexo 12. Ensamblaje y acondicionamiento de un fermentador de chicha de jora.



Anexo 13. Panel fotográfico de chicha de jora tratado con ultrasonido.



Anexo 14. Imagen de Tratamiento ultrasónico a 40 kHz.



Anexo 15. Panel fotográfico de los análisis con microscopio trinocular adaptado a un ordenador.



Anexo 156. Panel fotográfico del análisis de colorimetría.

